

中国生物化学会专题讨论会文集 (1)

免疫活性细胞与免疫方法进展

葛锡锐 编

.1573

510

植物

科学出版社



58.1573
610

中国生物化学会专题讨论会文集(1)

免疫活性细胞与免疫方法进展

葛锡锐 编

中国科学院植物所图书馆



中科院植物所图书馆



S0011774

科学出版社

1982

230520

内 容 简 介

本文集是由“免疫技术在分子生物学和细胞生物学中的应用研究”专题讨论会的综述性文章组成,一共十三篇。主要内容有常用细胞免疫的方法、免疫电泳、放射免疫、酶标记等等;核酸免疫化学;免疫化学在探测蛋白质分子溶液构象中的应用;免疫活性细胞、抑制细胞和巨噬细胞;细胞分离和淋巴细胞的激活;免疫杂交瘤法。本书可供医学和生物学的科研工作者和有关的大专院校师生参考。

中国生物化学会专题讨论会文集(1)

免疫活性细胞与免疫方法进展

葛 锡 锐 编

责任编辑 赵甘泉

科学出版社出版

北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1982 年 9 月 第 一 版 开本: 787×1092 1/16

1982 年 9 月 第一次印刷 印张: 11

印数: 0001—3,900 字数: 252,000

统一书号: 14031·36

本社书号: 2687·14

定 价: 1.75 元

前 言

中国生物化学会于一九八〇年九月十五日到十九日,在成都召开了一次题为“免疫技术在分子生物学和细胞生物学中的应用研究”的小型学术讨论会议。这是计划中于一九八〇年召开的四次小型会议之一。四川医学院事先做了不少准备工作,全部会程五天,安排极为紧凑,秩序井然,到会的七十多人,都一致称颂。生物化学界前辈四川医学院蓝天鹤教授,不辞辛苦,亲自主持大会;免疫学界前辈谢少文教授,兼程赴会指导,并作精湛的评述,均为会议生色不少。

过去的二十年左右,无疑为免疫学兴旺发达的年代。抗体的分子结构、补体各组分的逐步发现、B和T细胞的识别及其功能、淋巴细胞膜的细微结构等重要进展,都是此一期间的成果。免疫学由此进入分子水平,正在为很多综合性生物学现象提供确切解释的路途上前进。

现代免疫学是建立在生物化学、细胞生物学、生理学、遗传学等生物学的分支的基础之上的综合性学科,同时又是医药卫生等应用学科的理论基础。我国在二、三十年代已经播下了它的种子。此后,由于众所周知的原因,进展缓慢,有时甚至停顿。粉碎“四人帮”以后,免疫学的应用和理论研讨均获得重视,前进的趋势已经形成,今后的进展会比以往迅速。此次会议就“细胞免疫”和“免疫方法”二方面进行了广泛的交流,各专家所作综述共十三篇,特以《免疫活性细胞与免疫方法进展》为题,汇集成册,公开发行,供更多的读者参考。至于专题讨论会宣读的论文四十余篇,其摘要已由中国生物化学会编印成“论文摘要汇编”,为节省篇幅,这里不再重印。

沈 昭 文

1981年1月29日

编 者 的 话

应中国生物化学会之邀,参加了在成都召开的“免疫技术在分子生物学和细胞生物学中的应用研究”专题讨论会的审编工作。这次会议是我国免疫学工作者的一次盛会,所邀请的绝大多数专家都作了颇有参考价值的综述报告。其中,我国著名免疫学家,近八十高龄的谢少文教授在《常用细胞免疫方法的讨论》一文中,收集了国内发表的部分有关文献,对其优缺点、今后方向、应用的可能性等作了精辟的分析,深信对于开展实验室和临床的细胞免疫研究有很大推动作用。

免疫电泳、放射免疫和酶标记等方法已在国内普遍开展,这里除较系统地就其原理、方法和应用作一般介绍外,以作者们的切身体会就甾体激素和小肽分子的放射免疫方法作了较深入的专题记述。尤其是作者们又介绍了一些更为灵敏的方法,如光放射技术和超敏酶放射免疫测定等,有可能测定毫微微克的抗原分子,这些方法比只能测到微微克水平的放射免疫和酶标记法要灵敏 100—1000 倍,可供读者参阅。书中还有《核酸免疫化学及其应用》和《免疫化学在探测蛋白质分子溶液构象中的应用》的专题文章,据本人了解,国内的免疫书籍中尚属罕见,对有志从事这方面工作的同志将有所裨益。

本书还就免疫活性细胞,尤其是抑制细胞和巨噬细胞等作了专题讨论。对免疫活性细胞结构与功能的深入了解和研究,一直是免疫学中一个极其重要的中心研究课题,至今尚有不少问题未弄清,值得进一步探索。在细胞免疫工作中最常遇到的是细胞分离问题和淋巴细胞的激活问题,这里也请有关专家作了专题介绍。免疫杂交瘤法是近年来免疫学中兴起的一项新技术,目前已有一些文章开始介绍这方面工作,这里登载了一篇。

在本书的出版过程中,承中国生化学会袁士龙同志从组织、编辑、校对等各方面给以大力支持;又承中国科学院生物化学研究所洪炯、王美娟等同志对本书的插图、参考文献进行加工,使本书得以早日问世,谨向他们致以热忱的感谢。

葛 锡 锐

1981 年 1 月

目 录

I. 分子免疫学部分

免疫技术在蛋白质定性定量上的应用·····	孙芝琳 王道若 刘秉文 (1)
免疫化学在探测蛋白质分子溶液构象上的应用·····	曾庆镒 (19)
核酸免疫化学及其应用·····	胡世真 (29)
酶免疫测定技术进展·····	林性玉 张惠珠 (39)
甾体激素的放射免疫测定·····	丁 霆 朱忠义 (49)
小肽放射免疫分析近况·····	陆以信 张明芬 潘家秀 (67)

II. 细胞免疫学部分

常用细胞免疫方法的讨论·····	谢少文 (85)
凝集素的性质及其在免疫学上的应用·····	孙 册 (91)
免疫活性细胞的表面标志·····	邵国英 朱炳法 (103)
抑制细胞在免疫调节中的作用·····	吴慧君 (121)
巨噬细胞及其功能·····	南国华 黄文长 (132)
免疫活性细胞及其分离纯化·····	朱炳法 邵国英 (144)
免疫活性细胞的杂交及其应用·····	葛锡锐 (161)

第一節 總論

一、本館之宗旨

二、本館之方針

三、本館之組織

四、本館之經費

五、本館之設備

六、本館之服務

第二節 本館之發展

一、本館之歷史

二、本館之現狀

三、本館之未來

四、本館之貢獻

五、本館之榮譽

六、本館之成就

七、本館之展望

免疫技术在蛋白质定性定量上的应用

孙芝琳 王道若 刘秉文

(四川医学院)

一、引言

二、免疫电泳测定法

1. 对流免疫电泳

2. 电泳免疫扩散

3. 双向免疫电泳

4. 线形免疫电泳

三、放射免疫测定法

1. 基本原理

2. 基本方法

3. 放射免疫测定法在蛋白质定量分析上的应用

四、酶连接免疫吸附测定法

1. ELISA 的原理

2. ELISA 法操作中的几个问题

3. ELISA 在蛋白质定性定量上的应用

一、引言

蛋白质的测定,方法虽然很多,但大都从化学的角度对其定性定量。自从人们认识到蛋白质本身就是一类优良的抗原物质后,应用免疫技术测定可溶性蛋白质就广泛地引起了生物化学家的重视。就免疫技术论,从最初的试管沉淀反应,到琼脂凝胶中的扩散试验;由直接的沉淀反应到间接的凝集反应(如间接血凝、间接乳胶凝集);由琼脂扩散试验又发展到免疫电泳;几十年来由直接的抗原抗体反应检测到标记如荧光、放射性同位素、酶标记的抗原抗体检测法等等。方法一步一步的改善,灵敏度一步一步的提高,检测水平也由微克(μg)发展到微微克(pg)水平。

本文仅就免疫电泳、放射免疫测定法及酶免疫测定法(主要是酶连接免疫吸附测定法)的方法学基础,试验中注意问题,优缺点及其在蛋白质抗原、抗体的检测和应用上作一扼要复习。

二、免疫电泳测定法

可溶性蛋白质抗原与相应抗体在凝胶中可形成抗原-抗体复合物的沉淀线,这一特性很早就用于蛋白质的定性定量分析,如1948年 Ouchterlony 提出的双向免疫扩散法(DID)主要用于抗原定性,以及1963年 Mancini 等提出的单向圆周扩散法(SRID)用于抗原定量。1953年 Grabar 和 Williams 首先将电泳技术与双向免疫扩散相结合,发展为免疫电泳(IE),提高了对抗原检测的分辨力。上述方法至今仍广泛应用。近年来结合生物化

学分离技术进展,主要针对提高分辨力和灵敏度,又发展了一些新的免疫电泳方法,这方面的工作已有不少文献综述^[4-6],以下简单介绍其中几种。

1. 对流免疫电泳

对流免疫电泳 (Countercurrent immunoelectrophoresis, CIE) 是抗原与抗体在凝胶中同时进行电泳的一种定性或半定量方法,由 Bussard 首先提出。在琼脂或琼脂糖凝胶板相隔一定距离的孔中,负极端加抗原,正极端加抗体,在 pH8.6 进行电泳,抗原由负极向正极移动,抗体借电渗作用缓慢地由正极向负极移动,抗原抗体相遇形成沉淀线。由于抗原抗体分子在电场作用下定向移动,限制了自由扩散,提高了相互作用抗原抗体的浓度,从而提高了灵敏度。CIE 一般较双向免疫扩散提高灵敏度约 10—16 倍,以测定甲胎蛋白 (AFP) 为例,最低检出量为 0.25—0.5 微克/毫升。电泳时间一般仅需 30—60 分钟。CIE 操作简单、快速、灵敏度高、不需要特殊仪器设备,短期可进行大量样品检测,近年来不仅广泛用于临床常规与普查,如 AFP, HBsAg 的检测,同时在蛋白质分离纯化过程中也是一种很好的监测手段。由于抗原-抗体复合物沉淀线,可因抗原或抗体过剩而溶解, CIE 有时出现假阴性反应。

用增强抗原抗体复合物沉淀的可见度以提高 CIE 法的灵敏度,属于这一类的试剂,常用的有 1% 鞣酸、0.5% 磷钨酸、右旋糖酐、聚乙烯醇以及特异性第二抗体等。如 Hamada 等^[7]用过氯酸提取人血清 CEA 为抗原,与羊抗 CEA 抗血清进行 CIE,未出现沉淀线,在第一次 CIE 后,用生理盐水充分洗去凝胶中的游离抗原、抗体蛋白质后,再于正极端抗体孔中加入第二抗体(即兔抗羊 γ -球蛋白),进行第二次 CIE,即可观察到沉淀线,与 CEA 放射免疫测定法对比,这种简单的半定量法测定 CEA 水平灵敏度近 10 毫微克/毫升。

2. 电泳免疫扩散

电泳免疫扩散 (Electroimmunodiffusion, EID) 又称“火箭”电泳 (Rocket immunoelectrophoresis) 是 1966 年 Laurell^[8] 提出的一种免疫定量方法。抗原在含单价抗体的琼脂凝胶中电泳,在 pH8.6 条件下,抗原向正极移动,而凝胶中的抗体移动很慢,抗原抗体反应出现圆锥形的沉淀峰,随着电泳进行,未反应的抗原继续向前移动,顶端的沉淀峰为过剩抗原所溶解,前沿又形成新的沉淀峰,这一过程反复进行,直至抗原全部消失,此时沉淀峰的高度(或沉淀峰的面积)与抗原浓度呈正比关系,用标准抗原在相同实验条件下进行 EID,以峰值高度与抗原浓度绘制标准曲线,从标准曲线即可计算出未知抗原的含量。(图 1) EID 可以在混合抗原中借助于单价抗血清对其中的抗原定量,且沉淀峰值较 SRID 沉淀环直径大,灵敏度较高,误差较小,一般电泳时间仅需 3—4 小时,最低检测量为 0.5—1 微克/毫升。

对 EID 的改进如:

(1) 与放射自显影结合:不少实验室报道^[9]测定血清 AFP 时,于电泳样品中同时加入^[125]I-AFP 电泳后,用生理盐水漂洗,凝胶干燥后进行放射自显影测量火箭峰值。灵敏度提高到 10—20 毫微克/毫升。这种方法已广泛用于肝癌的早期诊断。

(2) 加大抗原量以提高灵敏度: EID 的灵敏度受到加样品量的限制,一般加样仅

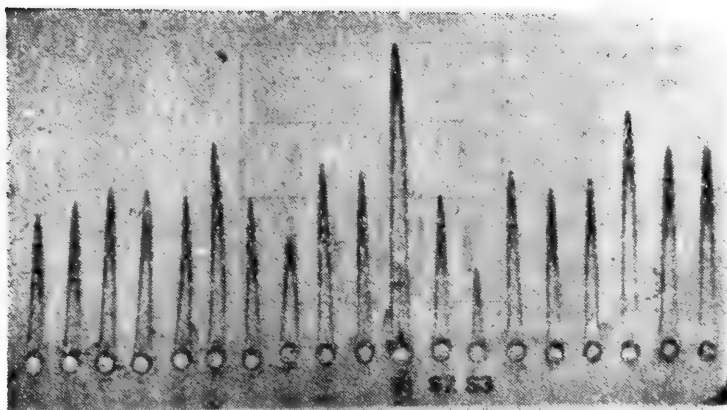


图1 火箭电泳图

S_1 , S_2 , S_3 为标准抗原,其余为待测抗原。

10—30 微升, $Kr\phi II^{[10]}$ 改用桥形样品管,加抗原量可达 0.1—10 毫升。对清蛋白定量一般为 1—5 毫微克/毫升,若样品用量为 10 毫升,清蛋白最低检测量可达 0.1 毫微克/毫升。中国科学院生物化学研究所报道^[11],用桥形免疫定量法测定 AFP,样品管内加待测抗原,加样后将样品管 A'B' 端放在凝胶板的 AB 孔内(见图 2),用 0.02M, pH8.6 巴比妥缓冲液,1.5—2 伏/厘米电泳 24 小时,即出现火箭峰。0.5—2.0 毫升样品管可检出 AFP 浓度为 2—10 毫微克/毫升,使普通免疫电泳的灵敏度达到放射免疫测定水平。如果把这一技术与放射火箭自显影原理结合,测定 AFP 的灵敏度可达 0.4 毫微克/毫升水平。

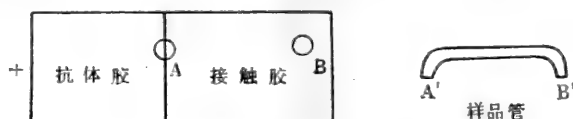


图2 桥形免疫定量板示意图。

(3) 改变抗原的化学特性: 某些蛋白质等电点与抗体分子接近,在常用 EID 条件下,这类抗原可以同时向正负极移动,不能形成可定量的火箭峰。一般采用不改变抗原性的条件下改变抗原的化学特性,以增加分子表面负电荷,从而增加向正极的电泳迁移度,以达到免疫电泳定量的目的。如 Weeke^[12] 用 $KCNO$ 处理免疫球蛋白,使分子中的氨基甲酰化,Slater^[13] 用甲醛处理免疫球蛋白,封闭分子中带正电荷的氨基,均能使免疫球蛋白形成正极可定量的沉淀峰。此外, Lou 等^[14] 用双功能基试剂戊二醛,使免疫球蛋白分子与清蛋白分子交联,交联分子可以保持两者的抗原性,但免疫球蛋白分子却具有近似清蛋白的电泳迁移度,可以用抗免疫球蛋白血清进行 EID 定量。

(4) 免疫选择技术 (Immunoselection)^[15], 是 EID 与特异性吸收相结合,用于对免疫球蛋白的重链或轻链分析定量技术。如重链病人血清中重链可被选择性定性或定量(见图 3)。电泳时凝胶 A 中的抗轻链抗体与病人血清 (t) 和正常人血清 (n) 中完整的免疫球蛋白分子结合,出现沉淀峰,而不与重链结合。随着电泳进行,重链向凝胶 B 迁移,同时由于电渗作用,凝胶 C 中的抗重链抗体向凝胶 B 移动,在凝胶 B 中重链与其抗体相遇,即形成火箭峰。

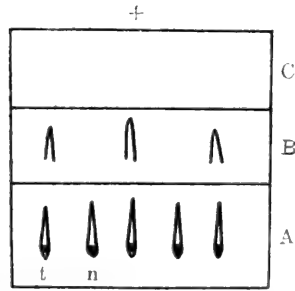


图3 免疫选择火箭电泳图 n. 正常人血清, t. 病人血清。

3. 双向免疫电泳

双向免疫电泳 (Two dimensional immunoelectrophoresis. 2-D EID) 又称交叉免疫电泳 (Crossimmunoelectrophoresis) 是, 1965 年 Laurell^[16] 在 Ressler 工作的基础上提出的。抗原先在琼脂凝胶中进行第一向电泳, 抗原按电泳迁移度在凝胶中分离, 然后在抗体凝胶中成 90° 进行第二向电泳, 与 EID 原理相同, 形成多个火箭沉淀峰 (图 4) 每一个沉淀峰代表一种抗原, 根据沉淀峰的数目、位置、形状、峰值与标准抗原比较等可以对未知抗原定性 & 定量。由于很少有两种抗原电泳迁移度相同, 沉淀峰的高度和形状也相同的情况, 所以 2-D EID 的电泳图谱具有很高的分辨力。由于 2-D EID 的高分辨力, 它主要用于抗原定

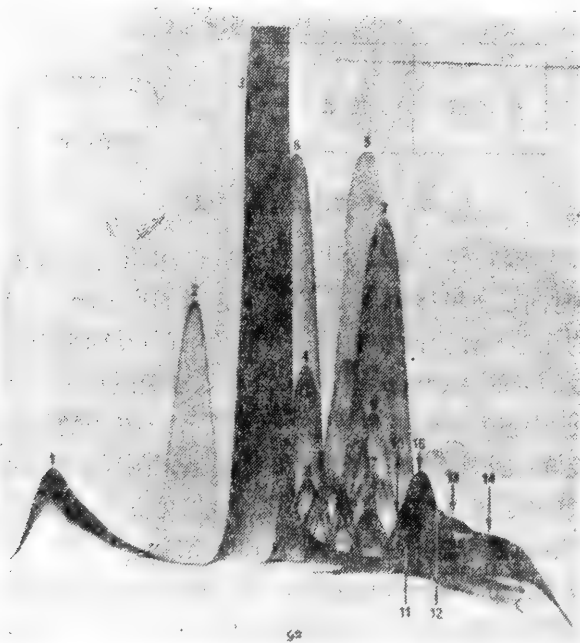


图 4-a 人血清蛋白-抗人血清蛋白双向免疫电泳图。

图中数字表示部分蛋白质沉淀峰。如 1. 清蛋白标准, 2. 前清蛋白, 3. 清蛋白, 4. α_1 -脂蛋白, 5. α_2 HS 糖蛋白, 6. α_1 抗胰蛋白酶球蛋白, 7. 触球蛋白, 8. α_1 易沉淀糖蛋白, 9. GC 球蛋白, 10. α_2 巨球蛋白, 11. β_1 -A(C₃), 12. β_1 -C(C₃), 13. IgA, 14. IgM, 15. 血液结合素, 16. 转铁蛋白, 17. β -脂蛋白。

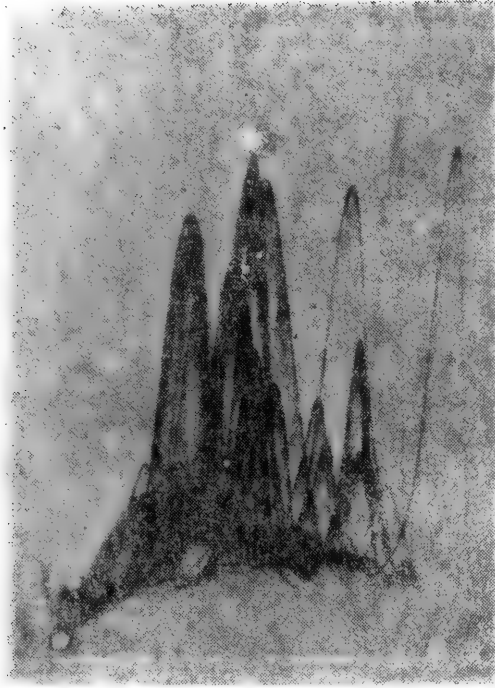


图 4-b 白色念珠菌抗原-抗白色念珠菌抗体双向免疫电泳图。图中显示 67 个沉淀峰

性鉴定,2-D EID 中混合抗原各组分含量不同,不可能使每一组抗原抗体均达到最适比例,所以在一次电泳图谱中难于对多数或全部组分定量。

目前对2-D EID 技术亦有不少改进,应用较多的是与聚丙烯酰胺凝胶电泳^[17]或聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦相结合^[18],以这些电泳分离为第一向。近来还应用非离子去污剂,如2% Triton x—100 提取膜蛋白,同时在进行2-D EID 时凝胶中亦保持一定的 Tritonx—100 浓度,使水不溶性膜蛋白与抗膜蛋白抗体反应,这样可对人红血球细胞膜,肝细胞膜蛋白进行分析^[19,20]。

4. 线形免疫电泳

线形免疫电泳 (Line immunoelectrophoresis) 是一种对抗原可同时定性、定量技术。1969 年 Krøll^[21] 首先应用。将抗原、抗体分别加入琼脂凝胶中,制成含抗原凝胶与含抗体凝胶。不同的抗原凝胶并列为负极端,将抗体凝胶与抗原凝胶连接,抗体凝胶为正极端。在电场作用下,抗原根据其浓度和电泳迁移度向抗体凝胶中移动,结果生成多条平行的沉淀线(图 5)相同抗原的平行沉淀线发生融合,由此可定性鉴定。在一定条件下沉淀线与抗体凝胶底线的距离与抗原浓度呈正比关系,可以定量。其优点是抗原加于凝胶中,所加样品用量较一般免疫电泳多,灵敏度较 2-D EID 高,并且只需进行一次电泳即可。但由于需制备几种不同的抗原胶和抗体胶,操作步骤稍多,同时抗原和抗体用量多,在应用中不如2-D EID 广泛。

上述几种类型的免疫电泳方法,均可以与同位素标记、酶标记、酶染色及特殊染色法结合。目前已广泛应用。



图5 线形免疫电泳对脑脊液蛋白质的定性和定量。

抗原胶: a. 含 40% CSF(V/V), b. 含 0.3% 血清+9% CSF(V/V), c. 含 0.3% 血清 (V/V)
抗体胶: 含兔抗人血清蛋白抗体 3% (V/V)。

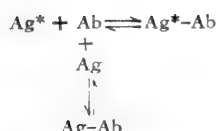
综上所述,免疫电泳分析操作简单,容易掌握,不需要特殊仪器设备,具有高度特异性、高分辨力和灵敏度。虽然这类方法需制备抗血清,抗血清用量也较大,方法的稳定性稍差和难标准化,但它在生物科学、医学等理论研究及实际应用中,仍是一类重要的蛋白质定性和定量的分析方法。

三、放射免疫测定法

1959 年 Berson 及 Yalow^[22,23] 在研究胰岛素免疫特性的基础上,利用标记与未标记抗原与一定量抗体竞争性结合的原理,创立了放射免疫测定法。用这种方法能测定 10^{-9} — 10^{-12} 克/毫升水平的蛋白质及多肽。放射免疫测定法具有专一性强、灵敏度高、标本用量少、方法简便、可成批大量测定等优点,为多肽、蛋白质的超微量测定开辟了广阔道路,极大地推动了多肽、蛋白质激素的理论研究与实际应用。放射免疫是定量分析方法发展史上的一个重要里程碑^[24]。目前认为,凡具有抗原性及半抗原性的物质都可用这种方法测定。

1. 基本原理

定量抗体 (Ab) 加入过量非标记抗原 (Ag) 及标记抗原 (Ag*) 中,这两种抗原即按质量作用定律定量地竞争性与抗体结合,形成抗原-抗体复合物 (Ag-Ab 及 Ag*-Ab)。



此反应是可逆的。当 Ag^* 和 Ab 的量保持相对恒定, 则 Ag^*-Ab 复合物的生成量受 Ag 量的制约。若待测 Ag 量少则 Ag^*-Ab 复合物生成量多; 反之, 若 Ag 量多, 则 Ag^*-Ab 复合物生成量少; 即 Ag^*-Ab 复合物的生成量与 Ag 量呈一定函数关系(图 6)。 Ag^*-Ab 复合物可借不同方法从上述反应系统中分离出来定量测定。根据在各种不同浓度标准抗原下所形成 Ag^*-Ab 复合物量的多少绘出标准曲线, 从而测出未知抗原的含量。

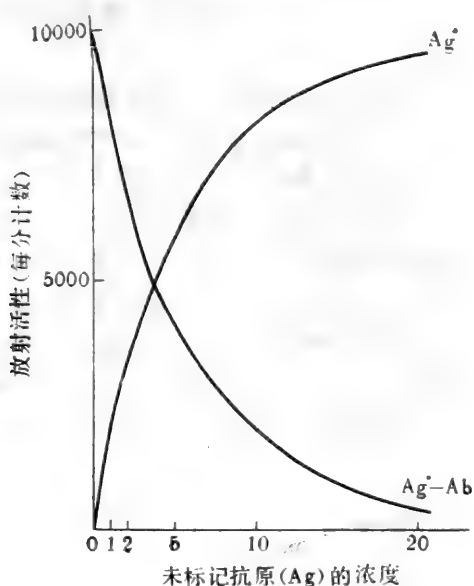


图 6 标准曲线

未标记抗原 (Ag) 浓度增加, 引起 Ag^*-Ab 复合物下降, 游离标记抗原 Ag^* 增加。

2. 基本方法^[24-26]

放射免疫测定必需具备以下三个基本条件。

(1) **抗原的纯化和标记** 制备高纯度的抗原是放射免疫测定的重要条件。一般抗原纯度不应低于 90%。从生物组织或体液中提取的蛋白质或多肽(分子量 >5000 者)抗原性强, 但不易得到高纯度制品。近年来国外已用人工合成法制备高纯度抗原。ACTH、 α -MSH、 β -MSH、加压素、催产素、血管紧张素 I 及 II、降钙素及胰泌素均已人工合成。类固醇、小肽、核苷酸、前列腺素、维生素、药物等低分子物质本身不具抗原性, 需与蛋白质或聚合多肽共价结合才具有免疫原性。

标记抗原的质量是放射免疫测定的关键。供标记抗原用的同位素有 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^3H 及 ^{14}C 。类固醇、前列腺素等用 ^3H 及 ^{14}C 标记。绝大多数多肽及蛋白质均含酪氨酸, 因此常用 ^{125}I 或 ^{131}I 标记。放射性同位素碘较 ^3H 及 ^{14}C 比放射性高。据 Midgley^[29] 计算, 每个蛋白质分子标上两个原子的同位素, 其比放射性(居里/毫克分子) ^3H 标记的为 58.4,

^{125}I 为 4340, ^{131}I 为 32400。由于第一, ^{125}I 的 γ 辐射较 ^{131}I 低, 又没有 β 辐射, 因而 ^{125}I 标记抗原损伤较 ^{131}I 的少; 第二, ^{125}I 的半衰期(60 天)较 ^{131}I 的(8 天)长; 第三, ^{125}I 的丰度较高, 在 95% 以上; 第四, 计数效率较高, 因此常用 ^{125}I 标记。

标记碘常用氯胺 T 法^[30]。为减少氯胺 T 对标记蛋白质的损伤(如使 SH 基氧化), 加入氯胺 T 的量及反应时间均应限制。亦可采用乳过氧化物酶标记法。此法标记条件缓和、可减少蛋白质损伤, 提高标记率。

抗原标记后应立即纯化。常用的方法有纤维素柱^[23]及滑石粉^[33]吸附法、离子交换树脂法^[34]、凝胶过滤法^[30]、电泳法^[25]及透析法等。

(2) 抗体的制备 放射免疫测定除需标记抗原外, 还需专一性强、与抗原亲和力高和效价高的抗血清。这是放射免疫测定的另一关键。放射免疫测定的特异性及灵敏度均直接与抗体的质量有关。

放射免疫测定用的抗血清事先应进行鉴定。采用不同稀释度抗血清与标记抗原进行结合反应, 根据结合率可绘出抗血清稀释曲线(图 7)。对抗原亲和力高的抗血清, 其稀释曲线应呈 S 型。曲线上部由于抗血清稀释度小, 抗体量多, 所有标记抗原均被结合, 因而较平坦; 曲线下部由于抗血清稀释度大, 抗体量极少, 标记抗原几乎不被结合。应选择与标记抗原 20—70% 结合时曲线较陡部分的稀释度作放免测定用。此时抗体的浓度不足以结合所有标记抗原, 容许标记与未标记抗原与抗体发生竞争性结合反应。

抗血清对抗原的亲和力是影响放射免疫测定灵敏度的重要因素。特别在测定浓度较低(微微克/毫升)抗原时更需选用高亲和力的抗血清。抗体稀释曲线的陡度可作为判断抗血清亲和力大小的依据。曲线陡度愈大, 抗血清的亲和力愈高; 曲线愈平坦, 则亲和力

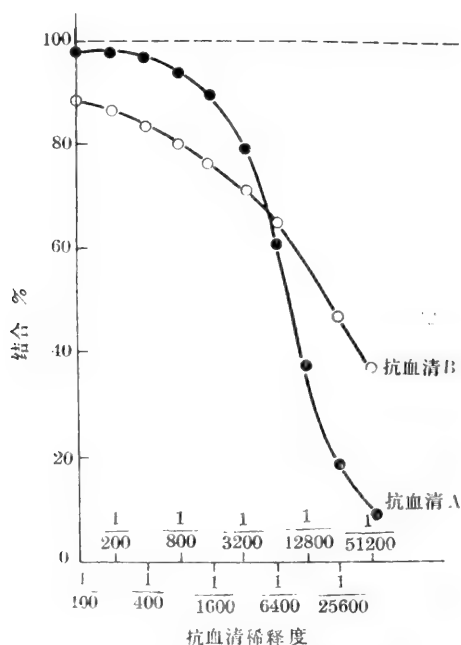


图 7 未加标记抗原时抗血清的稀释曲线

抗血清 A: 曲线呈 S 型, 下降陡度明显, 表示该抗血清对抗原 (Ag^*) 具较高的亲和力。

抗血清 B: 曲线较平坦, 表示该抗血清对抗原具较低的亲和力。

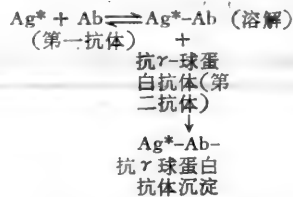
愈低^[25,26]。

抗血清的特异性是决定放射免疫测定特异性的关键。较好的抗血清只对一种专一的抗原发生结合反应,而不应或极少与其他抗原发生交叉反应。

(3) 结合 (B) 及游离 (F) 标记抗原的分离 这是放射免疫测定的另一不可缺少步骤。分离方法很多,常用的有以下几种类型。

(i) 吸附游离抗原的分离法: 活性炭、滑石粉及某些离子交换树脂能吸附游离抗原,不能吸附结合抗原。本法主要用于分离分子量较小的多肽及蛋白质抗原。TSH、FSH、LH 及某些酶蛋白,分子量较大,不能被吸附因而不能用这种方法分离。使用较多的有活性炭-右旋糖酐法^[35],滑石粉法^[36]及阴离子交换树脂法^[37]等。

(ii) 除去结合抗原的分离法: 应用最多的是双抗体法,又称免疫沉淀法。放射免疫系统中生成的 Ag^*-Ab 复合物是可溶性的。用抗体 (Ab, 第一抗体) 再免疫另一种动物产生第二抗体。第二抗体能与第一抗体及其 Ag^*-Ab 复合物共沉淀,从而达到其与游离抗原分离的目的。在实际应用中,



常用某种动物的 γ -球蛋白为第一抗体免疫另一种动物制备第二抗体 (抗 γ -球蛋白抗体)。双抗体法分离效果良好,不受反应液体积的影响,很少夹带游离抗原。其主要缺点是易受其他蛋白质干扰,其次是抗体用量较大。

此外还有盐析法^[25]、有机溶剂沉淀法^[25] (如 80% 乙醇、二氧杂环己烷 (dioxan)^[39]、12.5% 聚乙烯醇^[40]) 沉淀 Ag^*-Ab 复合物作胰岛素、ACTH、TSH 等的测定。这些方法对盐或有机溶剂的浓度要求严格。浓度过低, Ag^*-Ab 复合物沉淀不全; 浓度过高可引起游离抗原共沉淀。

(iii) 固相法: 用物理或化学方法将抗体结合在固相物质上,与抗原反应后 Ag^*-Ab 复合物即被吸附在固相物上,而游离抗原 (Ag^*) 仍留在反应液中,通过离心或洗涤即可将二者分开。这类方法称为固相法。

固相法于 1966 年首先由 Catt^[41] 提出。抗体结合在固相物质上的方法有两种: 第一,物理涂敷法^[41]。在 pH9.0—10.0 的碳酸盐缓冲液中,抗体能较牢固地吸附在聚乙烯、聚苯乙烯或聚丙烯管的内壁上。抗体的涂敷可按以下步骤进行。用 0.1M pH9.0—10.0 碳酸钠-碳酸缓冲液稀释抗血清 (1/5000—1/50,000)。取 0.5—5.0 毫升稀释抗血清入各小塑料管中,在室温下放置 12—16 小时后,吸出抗血清,用生理盐水及保温液洗去未被吸附的抗体。涂敷抗体试管可在 4℃ 或 -20℃ 储存数月。第二,化学结合法^[42]。用化学方法,通过共价键将抗体结合在固相载体上。其优点为结合牢固,不因 pH 及离子强度的改变而分解。常用的固相载体有葡聚糖凝胶、琼脂糖凝胶、纤维素及聚丙烯酰胺凝胶等。固相载体需经偶联剂活化才能与抗体结合。戊二醛可使聚丙烯酰胺凝胶的酰胺基与抗体的氨基形成稳定的共价键。溴化氰可活化多糖类载体的羟基使之与抗体的氨基相连。

由于抗体结合在固相载体上,因而简化了游离与结合抗原的分离程序,缩短了反应时间,使固相法成为一种简易、快速、很有发展前途的放射免疫测定法,已广泛应用于多种蛋白质的测定。

(iv) 电泳法^[23]: 由于结合与游离抗原在电场中的迁移率不同,因而利用电泳方法可将二者分开。作为电泳支持物有纸、醋酸纤维膜、琼脂糖凝胶及聚丙烯酰胺凝胶等,已用于胰岛素、生长素等的测定。

还有用凝胶过滤法分离的,但操作繁杂,实际应用较少。

3. 放射免疫测定法在蛋白质定量分析上的应用^[24-28]

放射免疫测定法除用于蛋白质测定以外,已应用于类固醇、活性肽、维生素、核苷酸、前列腺素以及药物等非蛋白质类物质的测定^[24-28]。就蛋白质而言,除激素蛋白质外,还可应用于酶、血浆蛋白质、免疫球蛋白、特异性抗体蛋白、特异性抗原、毒素蛋白以及其他蛋白质。截至目前为止,测定的生理活性物质估计至少有 300 种以上,而且还在不断扩大。现将放射免疫测定技术在蛋白质定量上的应用情况列于表 1。

表 1 放射免疫测定法在多肽及蛋白质测定上的应用^[14-28,41-45]

分类	已用放射免疫测定的项目
激素: 下丘脑 垂 体 甲状腺 甲状旁腺 胰 腺 胃肠道 胎 盘 肾 脏 血管活性肽 其 他	TRH, LRH, GRIH, P 物质 GH, ACTH, TSH, FSH, LH, α -MSH, β -MSH, ADH, 催乳素, 催产素, 神经垂体素 (Neurophysin), 脂解素, 松弛素(relaxin) 降钙素 甲状旁腺素 胰岛素, 胰岛素原, C-肽, 胰多肽, 胰高血糖素, GRIH 胃泌素, 胰泌素, 肠抑胃素, 舒血管肠肽, 肠高血糖素, 胃动素, 缩胆促胰素, 胃泌素四肽 HCG, HCG- β 亚基, HPL, HCS. 肾素, 红细胞生成刺激素 缓激肽, 血管紧张素 I 及 II. 表皮生长因子, 7S 神经生长因子, 生长素介质-C
酶	胃蛋白酶, 胰蛋白酶, 糜蛋白酶, C-酯酶, 羧肽酶 A, 凝血酶原, 凝乳酶, 凝乳酶原, 碳酸酐酶 I 及 II, 果糖 1,6-二磷酸酶, 胶原酶, 胰凝乳酶, 胰凝乳酶原, 多巴脱羧酶, 多巴羟化酶, 碱性磷酸酶, 胶原脯氨酸羟化酶, 淀粉酶, 乳酸脱氢酶, 磷酸肌酸激酶, 胞浆素, 胞浆素原等
血浆蛋白质	清蛋白, 纤维蛋白, 纤维蛋白原, 肌红蛋白, 铁蛋白, 甲状腺素结合球蛋白, 皮质激素结合蛋白, IgA, IgG, IgE, IgD, IgM, 本周蛋白, 载脂蛋白 AI, AII, 载脂蛋白 C _I , C _{II} , C _{III} , 备解素, 反应素, Rh 因子, 白细胞趋化因子, 补体。
抗 体	抗 RhoD 球蛋白, 抗甲状腺球蛋白, 抗反应素抗体, 抗 Rh 抗体, 抗 DNA 抗体, 抗血友病因子, 抗地高辛抗体, 溴抗抗体, 抗真球类病毒抗体, 抗百日咳免疫球蛋白, IgE 抗体, 风湿因子, 链球菌抗体
抗 原	乙型肝炎相关抗原, 甲型肝炎相关抗原, 过敏原, 草履虫表面抗原, 牛痘抗原, 热稳定肾上腺特异抗原, 人组织相关抗原, 血吸虫抗原, 葡萄球菌肠毒素 B, 肿瘤病毒特异抗原, 甲胎蛋白, 癌胚抗原, 哺乳动物 C 型病毒蛋白, 异位激素
其他蛋白质	β_2 -微球蛋白, 胶原蛋白, 蛇毒, β -血栓球蛋白, 糖蛋白, 人脑 100S 蛋白, 核蛋白体微粒, 唾液素等。

四、酶连接免疫吸附测定法

由于放射免疫测定法试剂较贵,某些同位素的半衰期短,需要复杂的设备来判读结果,在运送和操作过程中还必须有特殊的防护措施等问题,因此放射免疫测定法通常都在设备条件较好的实验中心进行。

酶免疫测定法,避免了放射免疫测定法的缺点。酶标记的试剂价廉、高度稳定、半衰期长;酶免疫测定法的灵敏度接近或稍低于放射免疫测定法,在结果的判读上可用肉眼观察或使用较简单的设备就可获得比较客观的结果。

酶免疫测定法是建立在抗原或抗体可以与酶连接,所形成的结合物既保留了免疫学的活性,又保留了酶的活性的基础上。这一设想首先为 Avrameas^[46] 和 Nakane^[47] 等的化学性结合工作所证实。其后 Sternberger^[48] 更证实酶与抗酶的抗体的结合也完全可能。

在酶免疫测定法中,早年的作者感兴趣的是肉眼测定和抗原定位。以后 Nakane 提出间接酶免疫法测定抗体,其原理与间接免疫荧光技术极其相似。Sternberger 等首先用间接法定量地测定抗体水平。

酶免疫测定法发展的第二阶段是将可溶性抗原或抗体连接到不溶性的固相物质上,这一方法就是目前称为“酶连接免疫吸附测定法(Enzyme Linked Immunosorbent Assay,简称ELISA)”的基础。Engvall^[49~51]、Van Weemen 和 Schuurs^[52,53] 是 ELISA 的最初几位作者,目前 ELISA 已应用到检测可溶性蛋白质抗原和抗体各个方面。

关于 ELISA 的原理和应用,国内外文献里已有多篇综述^[54~62]。1978 年我国卫生部与世界卫生组织在北京、上海两地联合举办了两期酶连接免疫吸附测定法的短训班,ELISA 这一新技术已在国内许多单位相继建立^[63,64]。下面再就其原理、应用及一些进展作一复习。

1. ELISA 的原理

ELISA 有多种试验方法。常用的有测定抗体的间接法、测定抗原的双抗体夹心法、竞争法以及测定 IgM 的新近建立的反向间接法等。分述如下:

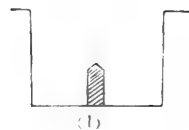
(1) 间接法(图 8) 本法用以测定抗体,按下述步骤进行。

- (i) 将有关抗原吸附到固相物质上,然后洗涤。
- (ii) 加入待测的试验血清,孵育,然后洗涤。
- (iii) 加入酶标记的抗球蛋白,使之反应,再洗涤。
- (iv) 加入酶的底物。底物降解导致颜色改变。颜色改变的程度和速度与第(ii)步试验血清中抗体的含量成比例。

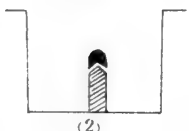
(2) 双抗体夹心法(图 9) 本法用以测定抗原,按下述步骤进行。

- (i) 将含有特异性抗体的免疫球蛋白或纯化的特异抗体(针对待测的抗原)吸附到固相物上,然后洗涤。
- (ii) 将疑为含有特异性抗原的待检试验溶液与致敏的固相物一起孵育,然后洗涤。
- (iii) 将固相物再与酶标记的特异抗体一起孵育,然后洗涤。
- (iv) 加入酶的底物。颜色改变与第(ii)步加入的试验溶液中抗原含量成比例。

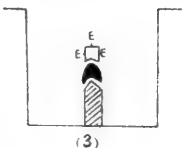
(1) 将抗原吸附于反应板上
上洗涤



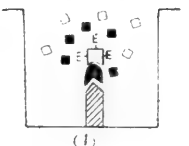
(2) 加待测血清; 特异抗
体与抗原结合洗涤



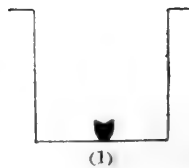
(3) 加酶标记的抗球蛋
白, 使与抗体结合洗
涤



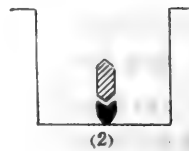
(4) 加底物
底物水解量 \equiv 抗体量



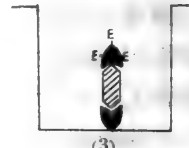
(1) 将抗体吸附于反应板
上洗涤



(2) 加含抗原的待测溶液
洗涤



(3) 加酶标记的特异抗体
洗涤



(4) 加底物
底物水解量 \equiv 抗原量

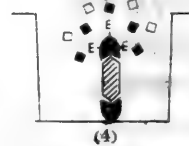
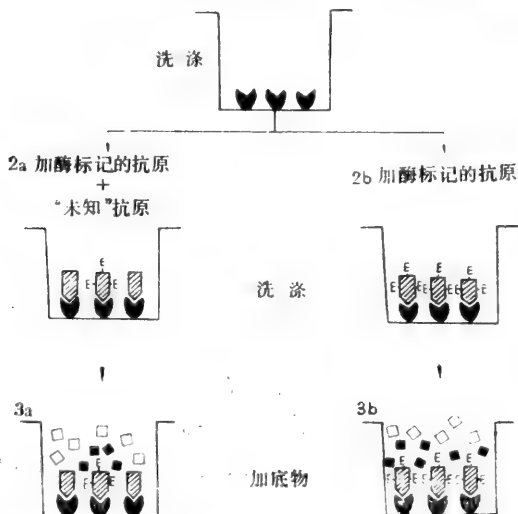


图8 ELISA 间接法测定抗体

图9 ELISA 双抗体夹心法测定抗原

(3) 竞争法(图 10) 本法用以测定抗原,按下述步骤进行。



底物水解量 \equiv 标记的[抗原]量 3a 与 3b 之差 \equiv 未知[抗原]量

图 10 ELISA 竞争法测定抗原

(i) 将特异抗体(或含有特异抗体的免疫球蛋白)吸附到固相物上,然后洗涤。
(ii) 加入待测的抗原溶液。同时或过一短吋后,加入酶标记的抗原,孵育,然后洗涤。
(iii) 加入酶的底物。只有含酶标记的抗原对照孔(无待测抗原)呈现颜色反应。在试验孔中,标本抑制颜色改变的强弱与标本中抗原含量成比例。

(4) 反向间接法(图 11) 1978 年 Duttmyer 和 Van der Veen^[62] 提出用反向间接法来测定对抗原特异的 IgM。包括两种测定法:

第一种方法的步骤是:

- (i) 将抗 IgM 吸附到固相物上,然后洗涤。
 - (ii) 加入待测抗体,孵育,然后洗涤
 - (iii) 加入酶标记的病毒抗原,孵育,洗涤。
 - (iv) 加入酶的底物。颜色改变的程度与速度与试验标本中特异性 IgM 的含量成比例。
- 第二种方法的步骤是:

- (i) 将抗 IgM 吸附到固相物上,然后洗涤。
- (ii) 加入待测抗体,孵育,然后洗涤。
- (iii) 加入病毒抗原,使与特异性 IgM 结合,然后洗涤。
- (iv) 加入酶标记的抗病毒抗体,使之与病毒抗原结合,然后洗涤。
- (v) 加入酶的底物。颜色改变的程度与速度与试验标本中特异 IgM 的含量成比例。

2. ELISA 法操作中的几个问题

(1) 固相物质 凡适于放射免疫测定的固相载体都适用于 ELISA。已用过作为固相的材料所制成的颗粒有纤维素、聚丙烯酰胺、交联葡聚糖和多种塑料。由聚苯乙烯(polystyrene)或聚丙烯(polypropylene)制成的试管也很合用。但是使用“微量反应板(microplate)”无疑在大规模试验中特别合用,且经济合算。因为采用微量反应板只需很少试剂。

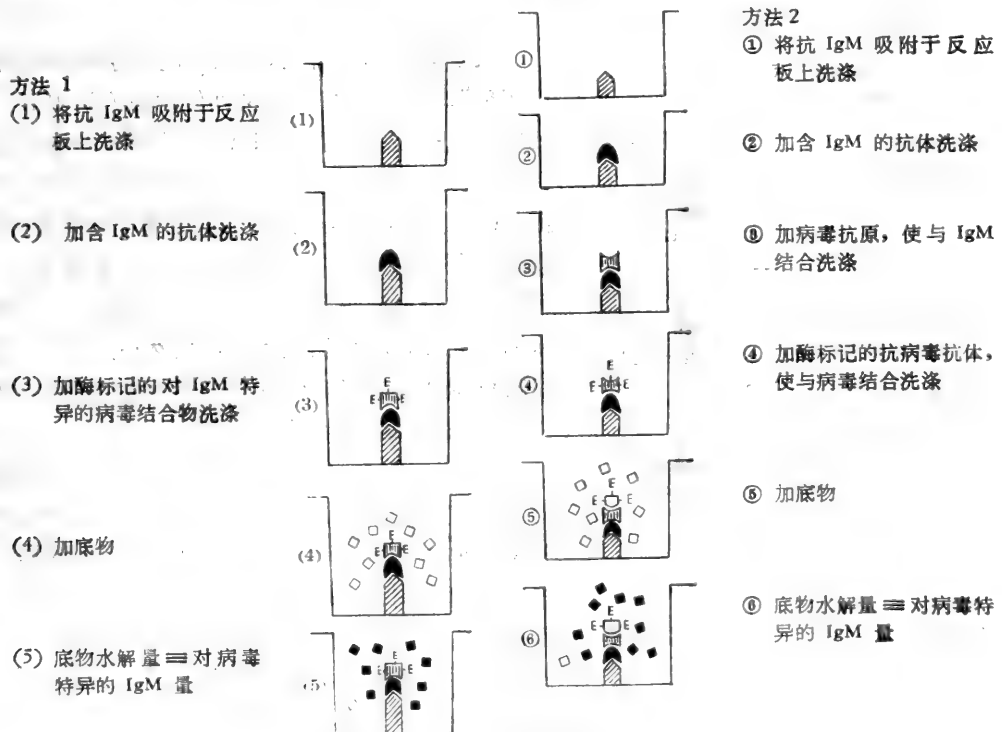


图 11 ELISA 反向间接法测 IgM

聚苯乙烯反应板特别适用于包被多种蛋白质和脂蛋白抗原。反应板可在碱性溶液中被动致敏；聚乙烯氯化物 (polyvinylchloride) 反应板也在碱性情况下特别适于包被抗体，用于双抗体夹心法。准确的最适包被条件，如试剂的浓度、时间、温度、pH 等最好通过实验来决定。条件一经建立，就应严格遵循。适于大多数蛋白质被动致敏的条件是每毫升含 1—10 微克的蛋白质溶液，用碳酸盐-重碳酸盐的缓冲液，pH 9.6 和在 4℃ 下吸附 2—4 小时。

在双抗体夹心法中，一些作者用特异抗体包被固相物，另一些作者认为抗体的免疫球蛋白组分合用。

(2) 洗涤 在酶免疫测定中包括不同试剂的孵育，每一试剂加入前必须经过洗涤。很明显，如果要使测定得到成功，每一洗涤步骤都必须充分，以免上一试剂带入下一步。

(3) 试验样品 在间接法中供抗体测定的标本通常是血清和血浆，偶尔也有其他液体，如脑脊液或唾液。通常用含润湿剂(吐温 20)的缓冲液稀释标本，这样可避免非特异成分吸附到固相上。连续稀释标本至反应终点，或使样品能与标准血清进行比较。然而，为大多数目的，“未知”标本可以一个稀释度进行试验。如果试验已作过充分标化，那末血清单个稀释度所得的结果，就可与参考标本比较。

(4) 结合物 曾对几种酶是否适于标记抗原或抗体进行研究。酶和酶作用的底物必须稳定、具有高度反应性、价廉或易于获得。常用的酶有辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶。

酶可与抗体(或抗原)以各种方式偶联。Avrameas 提出的“戊二醛一步法”^[46]是既容易制备又能制出高反应结合物的方法。稍后，制备过氧化物酶的结合物推荐用“戊二醛二步法”^[66]，它能制得均一的结合物，是一分子酶对一分子蛋白质具有克分子比关系的结合物。

Nakane 和 Kawasi^[67] 提出的过碘酸盐法可制得高度均一的结合物，但各批次间可能出现差异。

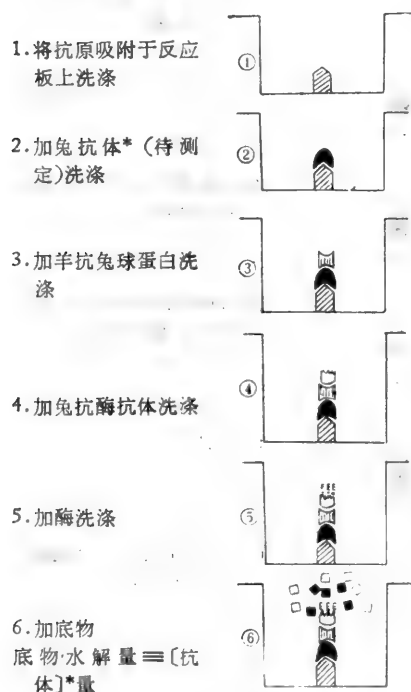


图 12 ELISA 酶-抗体法测定抗体

关于结合物的讨论，除以上的化学性结合外，还应包括“过氧化物酶和抗过氧化物酶(即 PAP)”系统中的免疫性结合。在 PAP 系统中，试验样品(如兔抗体)是要与固相抗原一起孵育的，然后加入抗球蛋白(如羊抗兔)再加入抗酶的抗体(如兔抗过氧化物酶)(图 15)；这最后一步加入的抗体会与过氧化物酶反应形成酶与抗酶的复合物，在加入了抗酶抗体后加入酶，最后加入底物。虽然在这 PAP 系统里孵育步骤加多了，但这样的免疫性结合要比化学方法所制得的结合物优越得多。

至于标记材料的纯度问题，主要取决于进行鉴定的性质。抗体的纯度并非经常都要求用免疫吸附法来纯化。Voller 等认为用硫酸铵或硫酸钠沉淀的抗血清得到的免疫球蛋白，已适用于酶标记。然而经亲和层析纯化的抗体在间接法中只出现微弱的背景水平，且结合物能在更高的稀释度时使用。从免疫球蛋白中分离出的 Fab 片段，经酶标记后，在间接法中出现很高的活性。

酶与免疫球蛋白组分所形成的结合物,显然是稳定的。用碱性磷酸酶标记的抗人 IgG 制剂,在有防腐剂并以浓缩状态于 4℃ 保存,其活性至少保持一年半。过氧化物酶的结合物于冻干状态下保存,其活性也能保持相似的时间范围。

(5) 底物 作为酶的底物,必须价廉、安全和易于使用,多数作者选用产色物质。这些物质在降解前是无色的,降解后生成有色化合物。为了进一步提高敏感性,也有采用萤光底物的(即生成有萤光的产物)。采用 Methylumbeliferin galactoside 作为半乳糖苷酶的底物就是一例。但是,这就需要更复杂的萤光分光光度计来供测定了。

在正常情况下,容许底物反应进行一定时间,然后终止。终止反应常加强酸或强碱。适于底物孵育的时间,至少 20—30 分钟,最多不超过 1 小时,如果反应进行得太快,可用更淡的结合物重试;如果反应太慢,则可用较浓的结合物或孵于较高的温度下。

碱性磷酸酶结合物可用对-硝基苯磷酸盐(p-nitrophenyl phosphate)作为底物。酶与底物的反应容易终止,只须加入浓碱液(如 NaOH)即可,且黄色产物在一定时间内保持稳定。

过氧化物酶的底物已有多种。它们通常受 H_2O_2 氧化,过氧化物酶在这个反应中起接触剂的作用。在 ELISA 中最能满足过氧化物酶的底物是邻苯二胺(Ortho-phenylenediamine, 简称 OPD),它产生深桔黄色产物,高度溶解,在暗处稳定。它很适用于肉眼测定也很适用于分光光度计读数。

(6) 终点——结果 ELISA 的终点可用肉眼判读,也可用分光光度计测定。

肉眼判读结果一致、准确、一般只须报告“阳性”或“阴性”时适用。阳性反应呈现颜色反应,溶液在黄棕色范围内(400—500nm)有 0.1—0.2 的吸收,很容易与无色的“阴性”结果区别。肉眼观察也适于在连续稀释滴定中判定“终点”。

准确的读数只能用分光光度计。合用的仪器是能测定 300 微升或更少量的溶液,以及方便快速操作。效价太高的标本可稀释后再测定。

3. ELISA 在蛋白质定性定量上的应用

ELISA 可广泛用于抗原、抗体的测定。由于蛋白质本身就是优良的抗原;抗体——各种免疫球蛋白也是蛋白质,因而 ELISA 一经建立就在蛋白质定性定量的测定上广为采纳。目前应用最广的还是在感染性疾病的抗体测定上。采用 ELISA 间接法无论在细菌性、寄生虫性、病毒性和真菌性感染上都曾有报道;特异性 IgM 和 IgE 的测定也在病毒抗原、寄生虫抗原、花粉抗原所致的抗体方面作过测定。应用 ELISA 定量测定蛋白质抗原的工作,大都采用双抗体夹心法和竞争法,在这方面的应用也是多方面的,包括对细菌的毒素、病毒抗原、激素、血液中的抗原组分以及其他抗原的测定等。在这些工作中甲胎蛋白的测定,乙型肝炎表面抗原的测定最为满意,其灵敏度与放射免疫测定法接近。在癌胚抗原的测定上,灵敏度不如放射免疫测定法。在促甲状腺激素的测定上,效果也很好,下面将 ELISA 在蛋白质测定上的应用列表如下^[68]:

(1) ELISA 间接法定量测定特异性抗体的应用

(i) 细菌性感染: 布鲁氏菌、艾希氏菌、白喉杆菌、梭状芽胞杆菌、分枝杆菌、奈瑟氏菌、沙门氏菌、链球菌、密螺旋体、霍乱弧菌、耶森氏菌。

(ii) 寄生虫感染: 阿米巴、巴贝斯虫、囊尾蚴、棘球丝虫、利什曼原虫、盘尾丝虫、疟原虫、内脏移行性幼虫、弓浆虫、锥虫、旋毛虫、血吸虫。

(iii) 病毒感染: 腺病毒、柯萨奇病毒、巨细胞病毒、E-B 病毒、肝炎病毒、疱疹病毒、猪霍乱病毒、流感病毒、麻疹病毒、新城鸡瘟病毒、副流感病毒、鼠肺炎病毒、植物病毒、狂犬病毒、呼吸道合胞病毒、轮状病毒、风疹病毒、仙台病毒、水痘病毒。

(iv) 真菌感染: 曲霉菌、念珠菌。

(v) 其他: DNA、支原体、蛇毒、立克次氏体。

(2) ELISA 反向间接法用于定量测定

特异性 IgM 和 IgE:

抗 原	测定的免疫球蛋白类别
尘埃、动物皮毛、花粉	IgE
草花粉	IgE
风疹病毒	IgM
巨细胞病毒	IgM
狂犬病毒	IgM
沙门氏菌	IgM
弓浆虫	IgM
甲型肝炎病毒	IgM
锥虫	IgM

(3) 夹心法或竞争法定量测定抗原

被 测 抗 原	方 法
免疫复合物	夹心法
C _{1q}	夹心法
植物病毒	夹心法
肝炎病毒	夹心法
疱疹病毒	夹心法
鼠白血病毒	夹心法
轮状病毒	夹心法
胰岛素	夹心法和竞争法
人胎盘催乳激素	夹心法和竞争法
绒毛膜促性腺激素	夹心法和竞争法
癌胚抗原	竞争法
甲胎蛋白	竞争法和夹心法
霍乱毒素	竞争法
黄曲霉毒素	竞争法
肉毒毒素	夹心法
大肠杆菌肠毒素	夹心法
葡萄球菌肠毒素	夹心法
第 VIII 因子	夹心法
IgG	竞争法和夹心法
IgE	竞争法和夹心法
α -巨球蛋白	夹心法
铁蛋白	夹心法
α -2 触珠蛋白	夹心法
类风湿因子	夹心法
触珠蛋白	竞争法
蛇毒	夹心法

参 考 文 献

- [1] Axelsen, N. H. Boch, E., *J. Immunol. Method*, 1972, 1, 109.
- [2] Axelsen, N. H., *Scand. J. Immunol.*, 1975, 2, 230.
- [3] Verbruggen, R., *Clin. Chem.*, 1975, 21, 5.
- [4] Rose, N. R. Friedman, H., *Manual of Clinical Immunology*, 1976, 17.
- [5] Thompson, R. A., *Techniques in Clinical Immunology*, 1977, 1.
- [6] Crowe, A. J., *Advances in Clinical Chemistry*, 1978, 20, 182.
- [7] Hamada, S. et al., *Clin. Chim. Acta*, 1976, 66, 365.
- [8] Laurell, C. B., *Anal. Biochem.*, 1966, 15, 45.
- [9] 中国医学科学院肿瘤研究所免疫室: 肿瘤防治研究, 1975, 1, 12.
- [10] Krøll, J., *J. Immunol. Method*, 1976, 13, 333.
- [11] 中国科学院上海生物化学研究所四室肿瘤组: 生物化学与生物物理进展, 1978(4), 10.
- [12] Weeke, B., *Scand. J. Clin. Invest.*, 1968, 21, 353.
- [13] Slater, L., *Ann. Clin. Chem.*, 1975, 12, 19.
- [14] Lou, K. Bowers, J., *J. Immunol. Method*, 1975, 9, 69.
- [15] Gale, D. S., *Clin. Chem.*, 1974, 20, 1292.
- [16] Laurell, C. B., *Anal. Biochem.*, 1965, 10, 358.
- [17] Bjerrum, O. J. et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1975, 40, 489.
- [18] Berzins, K. et al., *FEBS Lett.*, 1976, 61, 71.
- [19] Converse, C. A. Papermaster, D. S., *Science*, 1975, 189, 469.
- [20] Maddy, A. H., *Biochemical Analysis of Membranes*, 1976, 378.
- [21] Krøll, J., *Scand. J. Clin. Invest.*, 1969, 24, 55.
- [22] Berson, S. A. Yalow, R. S., *J. Clin. Invest.*, 1959, 38, 1996.
- [23] Yalow, R. S. Berson, S. A., *J. Clin. Invest.*, 1960, 39, 1157.
- [24] Skelley, D. S., *Clin. Chem.*, 1973, 19, 146.
- [25] Felber, J. P., *Advan. Clin. Chem.*, 1979, 20, 129.
- [26] Felber, J. P., *Method of Biochemical Analysis*, 1974, 22, 1.
- [27] “放射免疫分析及其它放射体外测定法”编辑组: 放射免疫分析及其它放射体外测定方法, 1976, 7—23, 155, 原子能出版社, 北京。
- [28] 中国医学科学院第六室主编: 同位素技术及其在生物医学中的应用, 1977, 168—182, 221—237, 科学出版社, 北京。
- [29] Midgley, A. R., *Acta Endocrinol.*, 1969, 63, Suppl. 142, 163.
- [30] Greenwood, F. C., *Biochem. J.*, 1963, 89, 114.
- [31] Marchalonis, J. J., *Biochem. J.*, 1969, 113, 399.
- [32] Thorell, J. I. Johanson, B. G., *Biochem. Biophys. Acta*, 1971, 251, 363.
- [33] Yalow, R. S. Berson, S. A., *Nature*, (London), 1966, 212, 357.
- [34] Landon, J. et al., *Biochem. J.*, 1967, 105, 1075.
- [35] Herbert, V. et al., *J. Clin. Endocrinol.*, 1965, 25, 1315.
- [36] Rosselin, G. et al., *Nature* (London), 1966, 212, 355.
- [37] Mead, R. C., Klitgaard, M. M., *J. Nucl. Med.*, 1962, 3, 407.
- [38] Morgan, C. R. Lazarow, A., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1962, 110, 29.
- [39] Thomas, K. Ferin, J., *J. Clin. Endocrinol.*, 1968, 28, 1667.
- [40] Desbuquois, B. Aurbach, G. D., *J. Clin. Endocrinol.*, 1971, 33, 732.
- [41] Catt, K. Tregear, G. W., *Science*, 1967, 158, 1570.
- [42] Wide, L. et al., *Immunochemistry*, 1967, 4, 381.
- [43] David, R. et al., *New Engl. J. Med.*, 1979, 301, 1138.
- [44] Schonfeld, G. Pfleyer, B., *J. Clin. Invest.*, 1974, 54, 236.
- [45] Schonfeld, G. et al., *Metabolism*, 1979, 28, 1001.
- [46] Avrameas, S., *Immunochemistry*, 1967, 6, 43.
- [47] Nakane, P. K. Pierce, G. B., *J. Histochem. Cytochem.*, 1967, 14, 929.
- [48] Sternberger, A. et al., *J. Histochem. Cytochem.*, 1970, 18, 315.
- [49] Engvall, E. Perlmann, P., *Immunochemistry*, 1971, 8, 871.
- [50] Engvall, E. et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 1971, 251, 427.
- [51] Engvall, E. Perlmann, P., *J. Immunol.*, 1972, 109, 129.
- [52] Van Weeman, B. K. Schuurs, AHW, *FEBS Lett.*, 1971, 15, 232.

- [53] van Weenmen, B. K. Schuurs, AHWM, *FEBS Lett.*, 1972, 24, 77.
- [54] Scharpe, S. L. et al., *Current Statement Clin. Chem.*, 1976, 22, 733.
- [55] Voller, A. et al., *Bull WHO*, 1976, 53, 55.
- [56] WHO., *Bull. WHO*, 1976, 54, 129.
- [57] Schuurs, AHWM. Van Weenmen, B. K., *Clin. Chim. Acta*, 1977, 81, 1.
- [58] Engvall, E., *Med. Biol.*, 1977, 55, 193.
- [59] Voller, A. et al., *J. Clin. Pathol.*, 1978, 31, 507.
- [60] 吴安然: 医学参考资料, 1979, 1, 38。
- [61] 盛树力: 国外医学免疫学分册, 1979, 2, 75.
- [62] 朱关福: 北京医学, 1979, 1, 223。
- [63] 北京市神经外科研究所免疫组等: 中华医学检验杂志. 1978, 1, 77.
- [64] 汤特等: 天津医药, 1980, 8, 117.
- [65] Duermeier, W. van der Veen, *Lancet*, 1978, 2, 684.
- [66] Avrameas, S. Ternck, T., *Immunochemistry*, 1971, 8, 1175.
- [67] Nakane, P. K. Kawoi, A., *J. Histochem.* 1974, 22, 1084.
- [68] O'berine, A. J. Cooper, H. R., *J. Histochem. Cytochem.*, 1979, 27, 1148.

免疫化学在探测蛋白质分子溶液构象上的应用

曾 庆 镛

(中国科学院上海生物化学研究所)

一、引言

二、分子构象相似性的比较

1. 蛋白质的进化速度及其免疫原性
 2. 进化进程中氨基酸变异对构象的影响
 3. 同一蛋白质不同区域构象相似性的比较
- ## 三、抗原决定簇模拟肽作为决定簇构象的探测器
1. 溶菌酶抗原决定簇模拟肽
 2. 肌红蛋白抗原决定簇模拟肽

四、分子不同区域肽链折叠的速度与相互影响

五、溶液系统中蛋白质天然构象和任意构象的定量计算

六、抗体与抗原反应模型用于探讨构象变化的可能性

1. IgG 与多价抗原反应的模型
2. IgM 与多价抗原反应的模型
3. 非标记抗原与标记抗原竞争抗体的反应模型

七、结束语

一、引言

一般来说,蛋白质分子如果发生二级结构或高级结构的改变,就会导致构象上的变化。构象变化又会导致某些物理化学参数的变化,例如圆二色性、旋光色散、荧光偏振、粘度、Stokes 半径、沉淀常数、紫外光谱、对蛋白水解酶的敏感性、和对应抗体的亲和性等。反之,研究这些参数的变化规律,又有可能反过来推测构象的变化情况。

从六十年代初期起,随蛋白质化学的进展,抗原与抗体反应分子基础的研究也逐渐深入。在抗体分子的研究方面,多种免疫球蛋白的一级结构、立体结构和功能区陆续得到阐明;在抗原研究方面,许多一级结构和高级结构已经得到(或部分得到)阐明的蛋白质成为研究免疫化学反应原理的良好对象,研究较为深入的有鲸肌红蛋白、卵清溶菌酶、链球菌核酸酶、细胞色素 c、白蛋白等。抗原抗体反应专一性分子基础的研究,揭示了抗原构造的秘密,对球蛋白而言,它的免疫原性不仅取决于突出在大分子表面的抗原决定簇的数目和化学组成,而且还取决于它们在分子表面上的空间分布。抗原决定簇的专一性也不仅依赖其氨基酸的组成和排列,而且还依赖于决定簇所在部位的分子构象。有关免疫原性和抗原专一性的这些结论构成了应用免疫化学研究蛋白质溶液构象的基础,抗体对抗原决定簇构象的精细识别,为这类研究提供了必备的前提。抗原决定簇所在部位构象的改变必然会影响到相应的免疫化学反应,因此,这类研究的核心是如何根据免疫化学反应的变化规律去解释抗原分子构象的变化。

二、分子构象相似性的比较

每个蛋白质分子具有许多肽链折叠区,分子表面的每个突出部分都有可能成为具有免疫原性的抗原决定簇,但在特定的免疫条件下,仅某些局限的部位对被免疫的动物具有抗原性,这不仅与免疫原的供体(动物或植物、微生物或病毒等)和受体(被免疫的动物)之间在进化树上的差异有关,更重要的是与分子进化速度有关。随进化的进程,有的蛋白质

分子肽链上的部分氨基酸被另外一些氨基酸置换,从而影响到与抗原决定簇有关的构象,产生了免疫化学上的所谓交叉反应。但也有些蛋白质分子对进化表现出顽强的保守性,免疫化学上表现为被免疫动物对它的巨大耐受性。蛋白质一级结构和高级结构的阐明,为采用免疫化学方法估计不同生物种系中某些分子的构象相似性奠定了基础。

1. 蛋白质的进化速度及其免疫原性

Olievetskaya^[1]总结了每进化一百万年蛋白质分子上氨基酸变异的速度与产生抗体能

表1 蛋白质进化速度与产生专一性抗体能力之间的关系

蛋白质	氨基酸变异数/100 万年, 1 分子	抗体产生能力
纤维肽	90	强
生长激素	37	强
核糖核酸酶	33	强
IgG	32	强
血红蛋白	14	中等
肌红蛋白	13	中等
溶菌酶	10	中等
胰岛素	4	弱
细胞色素 c	3	弱
肌动蛋白	<3	弱
组蛋白 I	慢	弱
组蛋白 IIB ₁ , IIB ₂ , III	很慢	很弱
组蛋白 IV	0.06	观察不到

表2 不同种属细胞色素 c 的免疫交叉反应能力*

细胞色素 c 来源	兔抗马细胞色素 c, %		兔抗人细胞色素 c, %		兔抗猕猴细胞 色素 c, %	与马细胞色素 c 比较, 氨基 酸变异%
马	100	100**	10	8**	12	0
驴	100	100	11	12	—	1
牛	60	84	12	17	16	3
绵羊	60	87	12	18	—	3
猪	60	83	12	18	16	3
类长颈鹿	60	84	—	—	—	—
非洲大羚羊	60	88	—	—	—	—
长须鲸	45	44	—	—	—	5
美洲红驼	39	27	20	11	16	—
兔	35	22	13	24	22	6
大袋鼠	38	28	33	30	20	7
河马	26	32	20	18	25	—
狗	25	12	20	—	—	—
鸡	19	10	4	10	—	11
火鸡	19	10	4	10	13	11
猕猴	25	0	70	45	100	11
黑猩猩	16	0	100	100	—	12
人	16	0	100	100	100	12
金枪鱼	27	0	4	5	8	17

* 以同源细胞色素 c 的最大反应值为 100%。

** 分别从两只兔子取得抗血清。

力之间的关系,认为进化快的分子,使被免疫动物产生抗体的能力强,反之则弱(见表1),对生物进化表现出顽强保守性的组蛋白IV,几乎不表现免疫原性,不能使动物产生抗体,而比组蛋白IV进化速度高1500倍的纤维肽表现出很强的免疫原性。因此,可以推测表1自上而下,随产生抗体能力的减弱,与被免疫动物的同种分子比较,不仅一级结构的相似性增大,构象的相似性也必然随之增大。

2. 进化进程中氨基酸变异对构象的影响

肽链上氨基酸变异如果影响到抗原决定簇的构型,在免疫化学上表现为交叉反应或亲和力和减弱。Margoliash等^[2]用人、马和猕猴来源的细胞色素c分别免疫兔,得到相应抗血清,用补体结合法和用异源细胞色素c竞争¹²⁵I标记同源细胞色素c的方法,对各种细胞色素c免疫交叉反应的能力进行了定量比较(表2)。

表2数据指出,虽然从两只兔得到的抗细胞色素c抗血清的反应能力不完全相同,但对氨基酸顺序相同的细胞色素c具有相同的免疫交叉反应能力,例如(1)牛、绵羊、猪;(2)鸡、火鸡;(3)猩猩、人。人细胞色素c 58位氨基酸为Ilu,猕猴细胞色素c 58位为Thr,两者其他部分相同,仅因一个氨基酸之差,免疫交叉反应能力降至45~70%。大袋鼠细胞色素c 58位为Ilu,与人相同,因而免疫交叉反应的能力明显比所有其他非灵长类细胞色素c为高,达30~33%。可以推测,细胞色素c第58位氨基酸在某抗原决定簇构型上起着重要作用。表2所列免疫交叉反应的强弱直接受蛋白质构象变化和抗原决定簇内氨基酸变化的影响,但目前尚难区分哪些是由于构象变化造成的结果和哪些是由于一级结构变化造成的结果。

3. 同一蛋白质不同区域构象相似性的比较

将一个蛋白质水解成若干肽段,如果不同肽段上的抗原决定簇有相同的构象,则在免疫化学上就会彼此竞争相同的抗体。Habeeb和Atassi等^[3-5]将牛血清白蛋白(BSA)用胰蛋白酶水解,柱层析分离得肽段BSA_{11~193}和BSA_{377~581}(参看图2)。BSA_{11~193}可抑制BSA和抗BSA抗血清的反应达83%,抑制BSA与抗BSA IgG反应达97%,可吸收掉抗体84~89%,说明少于BSA N端1/3肽链长度的肽段BSA_{11~193}几乎具有整个分子的免疫原性;完全类似的情况也在BSA C端1/3肽链长度的肽段BSA_{377~581}上见到,BSA_{377~581}可抑制BSA和抗BSA IgG反应达90~93%,可吸收掉抗体89~95%,这些结果说明,BSA C端1/3肽链也具有整个分子的免疫原性。BSA一级结构已清楚阐明^[6],氨基酸排列顺序上未见明显重复顺序,但具有15个环。整个分子大致可分三个区域,BSA_{11~193}和BSA_{377~581}分别相应于第一区和第三区,因此推测第一区和第三区抗原决定簇部位很可能有相似或相同的溶液构象。

三、抗原决定簇模拟肽作为决定簇构象的探测器

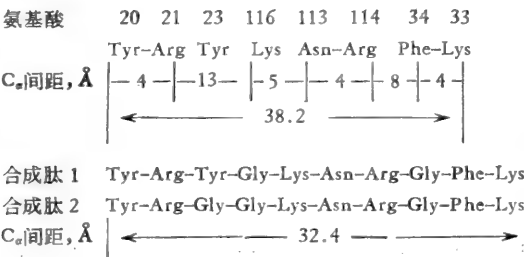
蛋白质一级结构和高级结构的阐明,为抗原决定簇在蛋白质分子上的精确定位奠定了基础。鲸肌红蛋白是第一个完成抗原决定簇全分析的蛋白质^[7]。此后,人工合成抗原决定簇模拟肽的研究陆续开展,用合成肽段去与待测抗原竞争抗体,根据竞争力的大小推

测抗原的结构和构型。因此,抗原决定簇模拟肽不仅能用于某一蛋白质抗原决定簇的精确识别,而且还有可能随模拟肽的积累而用于探测未知蛋白质抗原决定簇部位的构型信息。

1. 溶菌酶抗原决定簇模拟肽

Atassi 等^[8]于 1973 年报道用胰蛋白酶将溶菌酶水解成 16 个片段,发现其中三个片段抑制此酶与抗体的免疫反应达 85~89%,并测定了这三个片段的一级结构。三年后,他们根据这些肽段可能的空间走向,人工合成了具有很强免疫化学竞争力的模拟肽,精确地给出了三个抗原决定簇的构成和相对空间位置,其中两个如下:

决定簇 I^[9]



决定簇 II^[10]

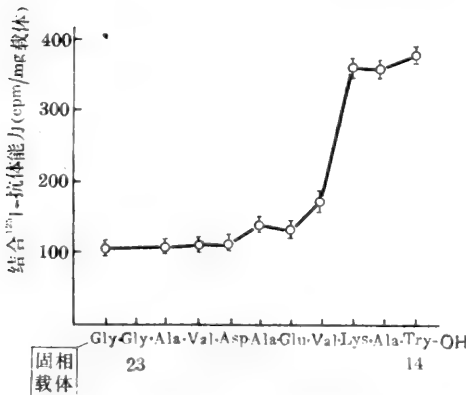
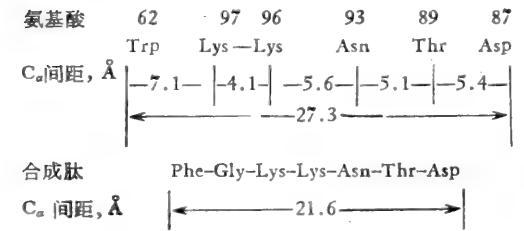


图 1 免疫化学竞争力与模拟肽的相关性

2. 肌红蛋白抗原决定簇模拟肽

为了更好研究模拟肽的合成与应用,Leach 等^[11]发展了 Atassi 的工作,改用多肽固相缩合法,将模拟肌红蛋白肽段 Mb_{14~24} 直接联在固相多孔载体上,与天然 Mb_{1~55} 竞争¹²⁵I-

抗体,发现只有待肽段合成到一定长度后,竞争抗体的能力才会出现(图1)。这一工作也证实 Atassi 等^[7]原来确定的这一抗原决定簇构成是正确的。

四、分子不同区域肽链折叠的速度与相互影响

一条新生肽链合成后,它是怎样折叠起来的? 它的折叠途径是什么? 这些都是当前许多研究室关注的问题。利用特异性抗体作为探测物,研究肽链折叠有其独特的优越性,能够同时测定分子表面几个抗原部位的肽链折叠情况。BSA 有 17 对—S—S—键和一个游离—SH 基团、八对半环结构,可分为三个相似的区域,每个区域由五个平行的 α 螺旋区组成^[6](图2)。全还原的 BSA 有 35 个—SH 基,如果重氧化时,35 个—SH 基随机结合成—S—S—键,BSA 就可有 2.2×10^{20} 个构型,显然这是与实际情况不符合的。因此 Benjamin 等^[12,13]、Atassi 等^[3-5]、Peters 等^[14] 实验室都选用 BSA 为对象进行研究。BSA 是目前用免疫化学法研究肽链折叠分子量最大的蛋白质。

Benjamin 等^[13]用 CNBr、胰蛋白酶将 BSA 水解成图 2 所示的各肽段,分离纯化这些肽段,再通过这些肽段用亲和层析法从总抗体中分离各肽段对应的抗体,以用作相应全还原肽段肽链折叠的探测物,研究各还原肽段重氧化时肽链的折叠速度和相互影响,结果列于表 3。他们认为:(1)对整个还原 BSA 肽链的折叠而言,BSA_{377~581}(区域 III)和 BSA_{115~184}(环 3)两个肽段折叠最快,彼此折叠速度相似;区域 III 比区域 I 折叠速度快;

表 3 还原 BSA 和各还原肽段重氧化时,恢复抗原性的肽链折叠速度

重氧化分子	探测抗体	k, 分 ⁻¹	6 小时内抗原活性恢复程度
1 BSA	抗 BSA 全分子	4.7×10^{-3}	47
2 BSA	抗 BSA _{1~138}	1.3×10^{-3}	33
3 BSA	抗 BSA _{184~581}	3.3×10^{-3}	33
4 BSA	抗 BSA _{377~581}	1.4×10^{-2}	60
5 BSA	抗 BSA _{184~306}	3.3×10^{-3}	33
6 BSA	抗 BSA _{115~184}	1.5×10^{-2}	75
7 T _{198~581}	抗 BSA _{184~581}	2.8×10^{-2}	100
8 T _{198~581}	抗 BSA _{377~581}	4.0×10^{-2}	100
9 T _{377~581}	抗 BSA _{377~581}	5.5×10^{-2}	100

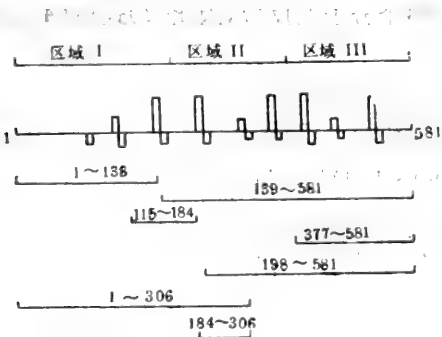


图 2 BSA 的区域、环结构和裂解片段

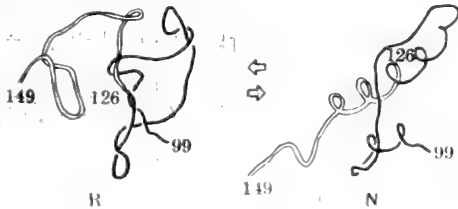


图 3 SNAase 肽段(99~149)天然构象N和无活性任意构象R互变平衡示意图

BSA N端的 1/3 个分子比 C 端 2/3 个分子的折叠速度快;区域 II 的一半($BSA_{184-306}$)和 C 端 2/3 ($BSA_{184-581}$)的折叠速度相同(比较表 3 中 1~6 行);(2) 比较表 3 中 7、8、9, 说明至少区域 II 和 III 可独立同时自行折叠;(3) 一个区域的折叠速度可受其他区域的影响, 比较表 3 中 3 和 7, 说明区域 I 对区域 II、III 的折叠有牵制作用;比较表 3 中 4、8、9, 说明区域 I 和 II 对区域 III 的折叠似有促进作用。

五、溶液系统中蛋白质天然构象和任意构象的定量计算

对某一肽段天然构象具有免疫化学活性的抗体, 只能特异地和具有天然构象的这一肽段结合, 而不能和变性构象的肽段结合。Sachs 等^[15-17]利用这一特征详细研究了链球菌核酸酶(以下简称为 SNAase)肽段(99~149)在溶液中两种构象的比例。

SNAase 只有在肽段(1~126)和(49~149)同时存在时, 两条肽链以非共价键相互作用而形成具有天然构象的互补结构, 才具有酶活性。如果溶液中只有肽段(99~149)存在时, 肽段以无序的任意构象存在, 也不显示酶活力。Sachs 等为了研究肽段(99~149)这一无序的任意构象系统中, 是否存在天然构象, 特地设计了一条免疫化学的探测途径。他们将天然 SNAase 分子裂解, 得到肽段, 分离并制备各肽段的亲和层析柱, 从抗 SNAase 的总抗体群中分得抗-(99~126)_N, 再按下面反应计算天然构象肽段存在量。

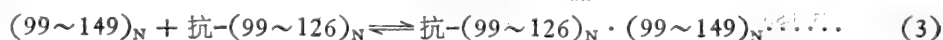
图 3 为肽段(99~149)天然构象(99~149)_N和无酶活性的任意构象(99~149)_R的模式图。



其构象互变平衡常数 $K_{\text{构象}}$ 为

$$K_{\text{构象}} = \frac{[(99 \sim 149)_N]}{[(99 \sim 149)_R]} \cdots \cdots \quad (2)$$

肽段(99~149)_N与抗-(99~126)_N的平衡常数 $K_{\text{结合}}$ 为



$$K_{\text{结合}} = \frac{[\text{抗}-(99 \sim 126)_N \cdot (99 \sim 149)_N]}{[\text{抗}-(99 \sim 126)_N][(99 \sim 149)_N]} \cdots \cdots \quad (4)$$

因为抗-(99~126)_N与(99~149)_R不发生反应, 抗-(99~126)_N与肽段(99~149)_N的反应基本上同于抗-(99~126)_N与 SNAase 整个分子的反应, 因此(2)式与(4)式可合并为:

$$K_{\text{构象}} = \frac{[\text{抗}-(99 \sim 126)_N \cdot (99 \sim 149)_N]}{K_{\text{结合}}[(99 \sim 149)_R][\text{抗}-(99 \sim 126)_N]} \cdots \cdots \quad (5)$$

又因 $K_{\text{构象}} \ll 1$, 所以 $[(99 \sim 149)_R] \doteq [(99 \sim 149)]_{\text{总}}$, 则

$$K_{\text{构象}} = \frac{[\text{抗}-(99 \sim 126)_N \cdot (99 \sim 149)_N]}{K_{\text{结合}}[(99 \sim 149)]_{\text{总}}[\text{抗}-(99 \sim 126)_N]} \cdots \cdots \quad (6)$$

又因

$$[\text{抗}-(99 \sim 126)_N]_{\text{总}} = [\text{抗}-(99 \sim 126)_N] + [\text{抗}-(99 \sim 126)_N \cdot (99 \sim 149)_N] \cdots \cdots (7)$$

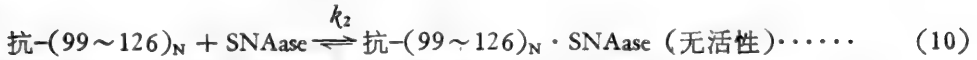
(7)式中 $[\text{抗}-(99 \sim 126)_N]_{\text{总}}$ 已知, 如能用其他方法求得 $[\text{抗}-(99 \sim 126)_N]$, 从(7)式即可求得 $[\text{抗}-(99 \sim 126)_N \cdot (99 \sim 126)_N]$, 最后从(6)式求得 $K_{\text{构象}}$ 。Sachs 等^[15]用酶动

力学的方法测定了[抗-(99~126)_N],即



酶活 k_1 可用 ΔA_{260} 测定,

$$\Delta A_{260} = k_1 [\text{SNAase}]_0 t \dots \dots \dots (9)$$



如将(3)式的反应系统引入(8)式反应系统,则(10)式中的[抗-(99~126)_N]可认为是(3)式中平衡后的浓度,则(10)式中的速度为

$$-\frac{d[\text{SNAase}]}{dt} = k_2 [\text{抗}-(99 \sim 126)_N] [\text{SNAase}] \dots \dots \dots (11)$$

积分(11)式,得

$$\ln [\text{SNAase}] = \ln [\text{SNAase}]_0 - k_2 [\text{抗}-(99 \sim 126)_N] t \dots \dots \dots (12)$$

将(9)代入(12),得

$$\ln (\Delta A_{260} / k_1 t) = \ln (\Delta A_{260} / k_1 t)_0 - k_2 [\text{抗}-(99 \sim 126)_N] t \dots \dots \dots (13)$$

从(13)求得 [抗-(99~126)_N],代入(7)式,即得 [抗-(99~126)_N · (99~149)_N],另外,根据实验设计已知 [(99~149)]₀,从其他实验测得上述反应的 $K_{\text{结合}} = 10^9 \text{ M}^{-1}$ 。代入(6)式,即可求得 $K_{\text{构象}}$,从而求得系统中天然构象和无活性任意构象的浓度比。

Sachs 等的结果列于表 4。从表 4 可见,肽段(99~149)单独存在时,

$$K_{\text{构象}} = 2.29 \times 10^{-4},$$

天然构象肽段仅~0.02%。较长肽段(50~149)单独存在时,与肽段(99~149)相似, $K_{\text{构象}} = 2.0 \times 10^{-4}$,天然构象肽段仅 0.02%。如果加入人工合成 SNAase 的肽段(6~43),因为它可代替天然肽段(6~48),具有和肽段(50~149)形成互补结构的能力。因此表 4 中的数据指出,肽段(50~149)因合成肽(6~43)的存在,天然构象肽从 0.02% 升高至 0.57%。如果用一般物理化学方法,是难以测得这些定量数据的。

表 4 肽段对抗-(99~126)失活 SRNase 的抑制

SNAase 肽 段	肽段浓度 (μM)	$t_{1/2}$ (秒)	游离抗- (99~126) 浓度(μM)	结合抗- (99~126) 浓度(μM)	$K_{\text{构象}}$ ($\times 10^4$)	天然构象 (%)
(99~149)	2.6	27	0.051	0.025	2.29	0.023
(50~149)	2.4	27	0.055	0.021	2.0	0.020
(50~149)	2.4					
+	+	226	0.0065	0.069	57	0.57
合成肽(6~43)	1.9					

六、抗体与抗原反应模型用于探讨构象变化的可能性

现有研究证明,抗体分子 IgG 是单一对称分子,两个结合位点,IgA 可看作二聚体分子,四个结合位点,IgM 可看作五聚体分子,共十个结合位点。抗体分子中的结合位点,彼此两两对称,与同一抗原决定簇的亲性和(结合常数)相等。当抗体分子与多价抗原反应时,其亲和力的强弱与反应位点的结合常数、各反应位点间的内在差异以及抗原决定

簇和抗体分子结合位点之间的局部空间关系等因素有关。对这些因素之间的函数关系,已有某些探讨。

1. IgG 与多价抗原反应的模型^[18] 反应可用图 4 表示

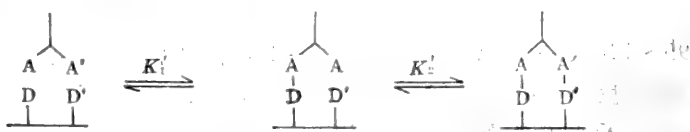


图 4 IgG 与多价抗原反应模型示意图

A 和 A' 分别为 IgG 的两个结合位点, D 和 D' 分别为多价抗原参加反应的第一和第二个决定簇, K_1' 和 K_2' 分别为二级反应和一级反应的平衡常数。

Crothers 和 Metzger^[18] 假定(1) 抗原决定簇在抗原分子表面上的分布是随机的;(2) 为避免因抗原量不足而造成抗体分子在抗原表面的相互干扰,抗原相对于抗体必须过量;(3) $F(ab)_2$ 在 IgG 分子上可通过“铰链点”自由转动。根据这些假设,求得 IgG 参加反应的空间函数 S^* 和反应平衡常数比例 K_2'/K_1'

$$S^* = \frac{3}{4\pi \langle r \rangle^3}$$

$$\frac{K_2'}{K_1'} = \frac{3V}{2 \langle r \rangle Na}$$

式中 $\langle r \rangle$ 为 IgG 中 $F(ab)_2$ 上两结合位点 A、A' 间的平均距离; N 为体积 V 内 IgG 分子数; a 为抗原决定簇分布的总面积。IgG 两结合位点的距离 r 是 $F(ab)_2$ 夹角的变量,如果能研究出 $F(ab)_2$ 夹角或 $\langle r \rangle$ 变化与抗原构象变化的定量关系,就有可能利用 Δr 去探讨抗原决定簇部位构象的细微变化。

2. IgM 与多价抗原反应的模型^[19]

贾万钧把 Crothers 等的概念延伸至 IgM 的反应系统上,反应可用下图表示。

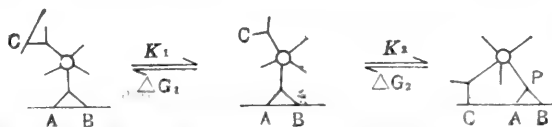


图 5 IgM 与多价抗原反应模型示意图

设(1)二级反应的平衡常数为 K_1 , 反应过程引起的自由能变化为 ΔG_1 , 一级反应的平衡常数为 K_2 , 反应引起的自由能变化为 ΔG_2 ; (2) $\Delta G_2 > \Delta G_1$, 即二级反应占优势。根据这些假设,推导出当 IgM 第一亚基 A、B 结合后,另一亚基结合位点 C 的空间分布函数 S_2 和反应平衡常数比例 K_2/K_1

$$S_2 = \frac{R_2}{\pi \langle r \rangle^2 R_1}$$

$$\frac{K_2}{K_1} = \frac{4VR_2}{NaR_1}$$

式中 R_1 是 Fab 接合部位 C 按 S_2 函数球面分布的球心到抗原表面的垂直距离; R_2 是 Fab 根部 P 点抗原表面的垂直距离(见图 5); $\langle r \rangle$ 、 N 、 V 、 a 的含义同前。同 $\langle r \rangle$ 一样, R_1 和 R_2 是变量, 如果能研究清楚变量 ΔR_1 和 ΔR_2 与抗原构象变化的关系, 就有可能利用 ΔR_1 和 ΔR_2 去探测抗原决定簇部位构象的细微变化。

3. 非标记抗原与标记抗原竞争抗体的反应模型^[20]

本文作者曾假设抗原分子各参加反应的决定簇与抗体结合部位的反应速度相等、平衡常数相同, 再根据放射免疫测定的一般原理, 求得参加反应的平均抗原决定簇数目与抗原浓度、抗体浓度和结合率的内在关系。

$$\frac{T}{B} = \frac{n[*Ag]_0}{2[Ab]_0} + \frac{n}{2[Ab]_0} [Ag]_i$$

式中 T/B 是结合率的倒数; $[*Ag]_0$ 和 $[Ag]_i$ 分别代表标记抗原和非标记抗原的浓度; $[Ab]_0$ 为二价抗体浓度; n 为实际参加反应的平均抗原决定簇数目。当抗原构象发生变化并影响到决定簇时, n 也会发生相应变化, 因此有可能根据 n 变化情况推测抗原构象变化的某些情况。

七、结 束 语

研究蛋白质溶液构象的手段很多, 例如核磁共振, 圆二色性、旋光色散、荧光偏振及某些生物化学方法。从本文讨论内容来看, 免疫化学也可作为研究蛋白质溶液构象的手段之一, 其特点是可利用抗体的高度专一性研究分子表面某些特殊区域的构象变化, 获得某些用其他手段难以得到的信息。但在解释所得数据时, 必须谨慎。免疫化学反应发生变化时, 构象或多或少已发生了变化, 但免疫化学反应未见差异时, 却不能轻易结论构象没发生变化^[21]。另外, 随免疫化学反应机理研究的逐步深入, 抗体有可能发展成为具有探测蛋白质抗原某些微小构象变化的分子探针。

参 考 文 献

- [1] Olievetskaya, M. M., *Molecular Immunol.*, 1979, **16**, 123.
- [2] Margoliash, E. et al., *J. Biol. Chem.*, 1970, **245**, 931.
- [3] Habeeb, A. F. S. A. and Atassi, M. Z., *J. Biol. Chem.*, 1976, **251**, 4616.
- [4] Atassi, M. Z. et al., *Immunochem.*, 1976, **13**, 547.
- [5] Habeeb, A. F. S. A. & Atassi, M. Z., *Immunochem.*, 1977, **14**, 449.
- [6] Bron, J. R., *Fed. Proc.*, 1975, **34**, 591.
- [7] Atassi, M. Z., *Immunochem.*, 1975, **12**, 423.
- [8] Atassi, M. Z., et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, **303**, 203.
- [9] Lee, C. L. & Atassi, M. Z., *Biochem. J.*, 1976, **159**, 89.
- [10] Atassi, M. Z. et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, **427**, 745.
- [11] Smith, J. A. et al., *Immunochem.*, 1977, **14**, 565.
- [12] Teale, J. M. & Benjamin, D. C., *J. Biol. Chem.*, 1976, **251**, 4603.
- [13] Teale, J. M. & Benjamin, D. C., *J. Biol. Chem.*, 1976, **251**, 4609.
- [14] Peters, T. Jr. et al., *J. Biol. Chem.*, 1977, **252**, 8464.

- [15] Sachs, D. H. et al., *J. Immunol.*, 1972, **109**, 1300.
- [16] Sachs, D. H. et al., *Proc. Natl. Amer. Soc. USA.*, 1972, **69**, 3790.
- [17] Sachs, D. H. et al., *Biochemistry*, 1972, **11**, 4268.
- [18] Crothers, D. M. & Metzger, H., *Immunochem.*, 1972, **9**, 341.
- [19] 贾万钧: 科学通报, 1978, **23**, 692。
- [20] 曾庆镒: 生物化学与生物物理学报, 1979, **11**, 181。
- [21] Kazin, A. L. et al., *Molecular Immunol.*, 1979, **16**, 457.

核酸免疫化学及其应用

胡世真

(中国科学院上海生物化学研究所)

- 一、引言
- 二、核酸的抗原性
 - 1. 核酸的构型决定免疫反应的特异性
 - 2. 抗核酸抗体对核苷酸顺序的识别能力
 - 3. 核酸的抗原决定簇大小及抗体结合位点
 - 4. 检测抗核酸抗体方法
- 三、自发抗核酸抗体与人类疾病
 - 1. 全身性红斑狼疮(SLE)及混合结缔组织疾病
 - 2. 其他自身免疫性疾病
 - 3. 病毒性疾病和寄生虫病
 - 4. 自发抗核酸抗体生成的可能因素
- 四、抗核酸抗体的应用
 - 1. 定性定量检测核酸和核酸组分
 - 2. 核酸结构功能的研究
 - 3. 亚细胞结构的研究
 - 4. 作为活性物质的专一抑制剂
- 五、展望

一、引言

免疫化学是一门既古老又具有旺盛生命力的学科。近年来,在免疫学领域里出现了不少新的生长点。鉴于核酸对生命现象的独特而重要的意义,自五十年代核酸的抗原性被发现之后,核酸的免疫化学研究引起了人们广泛的兴趣,并得到飞速的发展。核酸免疫化学研究的令人瞩目的成就,大大推动了免疫学本身,特别是医学、分子生物学和分子遗传学的研究,使核酸免疫化学在当今免疫学领域内占有令人瞩目的地位。

碱基(嘧啶、嘌呤)、核苷、核苷酸、寡核苷酸、人工多聚核苷酸以及核酸大分子都是半抗原,与适宜的载体蛋白(如甲基化牛血清白蛋白: MBSA)结合成复合物,各自可以实验地诱发高度特异的抗体——免疫球蛋白。自1897年P. Kraus发现蛋白免疫,1906年Ehrlich提出“锁和钥”的假说来解释蛋白质免疫化学本质以来,相隔了整整半个世纪,继多糖和某些脂类之后,核酸的抗原性才被认识,并推翻了早先的结论。事实上,几乎所有的核酸免疫化学的研究都是在最近二十多年中发展的。五十年代中期几乎没有证据可以说明核酸可诱发宿主产生抗体, Plescia等便开始研究DNA的抗原性,他们用酚抽提的含DNA丰富的制剂免疫家兔,得到能同该制剂起沉淀反应的兔血清。1960年Levine等报道了可实验地产生抗T₂噬菌体DNA的抗体。此外, Seligmamn、Deicher等实验室相继证明,该类含DNA制剂经脱氧核糖核酸酶消化后抗原性消失;证明DNA具有半抗原性特征^[1]。1957—1962年Ceppelloni、Holman等一些英、美、法研究工作者几乎同时发现红斑狼疮(SLE)患者血清中含有抗DNA抗体,更刺激了免疫学家探索核酸抗原性的兴趣。尤其是1964年Plescia应用MBSA作载体联结纯化的热变性DNA免疫动物,成功地获得抗DNA抗体^[2]。由于方法学上的突破,对核酸半抗原特性的研究出现飞跃,免疫学的新生点——核酸免疫化学有了蓬勃的发展。七十年代以后,抗核酸抗体的应用已深入到分子生物学和分子遗传学领域的许多方面;虽然对引起自发性抗核酸抗体机制说法不一^[2-5],但有越来越多证据表明多种人类疾病与核酸抗原性有着千丝万缕的联

系。应用抗核酸抗体对一些疾病的鉴别诊断和病程预后具有重大意义,目前还对核酸抗体生成的免疫调节机制进行了深入研究。

本文仅从核酸的抗原性方面简略介绍抗核酸抗体的一些应用和核酸免疫化学对医学的意义。

二、核酸的抗原性

1. 核酸的构型决定免疫反应的特异性。

天然 DNA (双链 DNA, dDNA)、变性 DNA (单链 DNA, sDNA)、双链 RNA (dRNA) 以及单链 RNA (sRNA) (包括 mRNA、rRNA 和 tRNA) 与载体蛋白质 MBSA 复合免疫动物后,都能获得各自高度特异的抗体,并且免疫反应上互不交叉。有趣的是,抗人工多聚双股核苷酸 $\text{poly}(\text{rA}) \cdot \text{poly}(\text{dT})$ 抗体可以高度识别 DNA · RNA 杂交分子。由此可知核酸含有依赖于高级结构的构型决定簇。

利用人工多聚核苷酸诱发的抗体在免疫反应所表现的特异性,是受核酸的高级结构所决定的。抗双股多聚核苷酸(如抗 $\text{polyI} \cdot \text{polyC}$) 抗体能识别同源或异源的双股核酸 ($\text{polyI} \cdot \text{polyC}$ 或 $\text{polyA} \cdot \text{polyU}$) 而不能识别三股核酸(如 $\text{polyA} \cdot 2\text{polyU}$),它不能与异源双股核酸 ($\text{polyG} \cdot \text{polyC}$, $\text{polyA} \cdot \text{polydT}$),也不能与 DNA、rRNA 起沉淀反应^[6,7]。抗三股核酸和抗单股核酸抗体也具同样的特异性。抗 $\text{polydT} \cdot \text{polydC}$ 抗体不能与天然 DNA 起免疫反应,即使 G·C 含量达 70% 以上也不能被抗体识别。所以,从目前知识来看,抗核酸抗体基本上是构型抗体。利用这种构型特异性,通过亲和层析法,能纯化具特殊结构的 tRNA^[8]。

2. 抗核酸抗体对核苷酸顺序的识别能力

尽管目前还未有充分证据证实核酸抗体能像抗蛋白质抗体一样可识别顺序上的精细差别而显示一级结构的高度专一性。但是,有许多研究工作者致力于这方面的工作,并已实验证实抗核酸抗体能识别短的寡核苷酸顺序。1977 年 Khan 等用 dpApT 、 dpApTpA 和 dpApApT 分别与 BSA 共轭免疫家兔,得到的抗体对各自的抗原高度特异,抗体能区别 dpTpA 和 dpApT ,能区别 dpApTpA 和 dpApApT ,抗体还能从四个核苷酸的片段中识别半抗原顺序^[9,10]。由于人工合成各种大小寡核苷酸片段技术已获成功,因此在不远将来有可能求得抗体能够专一识别的最大核酸顺序数^[9],有希望可测得核酸的顺序决定簇。

3. 核酸的抗原决定簇大小及抗体结合位点

抑制实验表明,抑制 sDNA 与抗 sDNA 抗体起免疫反应最有效的 5、6、7 个寡核苷酸,可见决定簇大小与蛋白质、多糖相近,在 15~50 Å。1977 年 Tohoku 等还测定了 DNA 与 SLE 病人血清中抗 DNA 抗体结合的决定簇为 4 到 5 个核苷酸,而 DNA 与人工诱发家兔抗 DNA 抗体结合仅为 2 和 3 个核苷酸^[11]。因此抗核酸抗体生成所需的免疫化学信息,与蛋白质系统一样,也局限于很小范围。1970 年 Lamon 深入研究了核酸抗原的有效部位,rRNA 抗原性并不因胰蛋白酶或牛胰核糖核酸酶的处理有明显改变,而经脾磷脂酸二酯酶处理后消失,认为核酸抗原决定簇似乎位于“核心”寡核苷酸处,该处嘌呤丰富,

并在其周围带有少量嘧啶^[12]。

抗核酸抗体与核酸结合是一个有趣的问题。首先抗核酸抗体是一个极不均一体系。1976年 Guignes 利用亲和层析法将抗 polyI·polyC 抗体分离提纯得到三个组分,即专一地抗 polyI、抗 polyC、或抗 polyI·polyC 抗体。在双扩散中 polyI、polyC 与 polyI·polyC 相互部分吻合,而与 polyA·polyU 的沉淀条纹则完全不吻合^[13]。说明抗体中包含了多种抗不同决定簇的抗体。对抗体与多聚核苷酸之间的免疫反应(物)进行了物化研究,一旦抗 polyI·polyC 抗体与 polyI·polyC 结合后, polyI·polyC 的热稳定性便增加了^[13]。用 X 光衍射技术观察到 polyI·polyC 和抗体 Fab 结合后,构型起了畸变^[7]。抗体与核酸的结合可能是多位点的。Guignes 认为, Fab 是和呋喃环上羟基起反应的^[7],每个 Fab 片段上覆盖了几个(3~4对)核苷酸,并有二个磷酸基团涉及了静电反应,结合位点的平面是 $0.9 \sim 1.5 \times 2.27 \text{ nm}^2$ ^[13]。Garcia-Orlagoza 观察到硬皮病患者血清中抗 DNA 抗体较少不均一性,基本上只与 RNA 的碱基作用,而 SLE 病人血清中则是非常不均一的,可与核酸分子上完全不同的位点相结合^[14]。

4. 检测抗核酸抗体方法

目前为止,凡蛋白质免疫化学上建立的检测技术基本上全已套用,灵敏度也相近。主要检测技术有:双扩散、补体固定法^[15]、血凝法^[16]、硫酸铵沉淀法(Farr 试验^[17])、对流免疫电泳法^[18]、免疫荧光法^[19]、放射免疫法、固相法^[20]、以及过氧化物酶酶标法^[21,22]。

Farr 试验能用于定量测定,但有假阳性,因为非免疫球蛋白的蛋白也能非特异地和 DNA、RNA 结合而被硫酸铵沉淀下来,并不能测定免疫球蛋白的亚型。免疫荧光法和过氧化物酶标法灵敏度很高,但不能精确定量抗体效价。目前还找不到既灵敏又可精确定量的好方法^[21]。

三、自发抗核酸抗体与人类疾病

SLE 血清中存在抗 DNA 抗体的事实(1957~1962),揭开了核酸免疫化学的序幕,以后又在其他自身免疫性疾病如干燥综合征(Sjögren's syndrome)、类风湿关节炎、重症肌无力、硬皮病、克隆氏病(Crohn's disease)和溃疡性结肠炎以及胰岛素依赖性糖尿病等患者血清中;在一些寄生虫和病毒感染者血清中,找到了多种抗核酸抗体。这些抗体的发现推动和加速了核酸免疫化学的研究,而核酸免疫化学研究的进展也深化了对这些疾病本质的了解。

1. 全身性红斑狼疮(SLE)及混合结缔组织疾病

目前了解最多的是 SLE 疾病。在 SLE 患者血清中可找到抗 sDNA、dDNA、sRNA、dRNA、核糖核蛋白体、核的核蛋白,以及抗碱基、核苷、核苷酸和人工合成多聚核苷酸的抗体。一位患者血清中可同时存在几种抗体,在免疫测定中互不干扰。抗体发生率因采用测定方法的灵敏度不同而结果不一。其他 MCTD 中也有抗核酸抗体,只是种类较少。效价稍低。硬皮病患者中存在抗 dDNA、sRNA,少数有抗核糖核蛋白体的抗体。类风湿关节炎、多发性关节炎患者也伴有抗 dDNA 抗体。抗核酸抗体除在血液系统中循环

外, Schuller 发现在多发硬化病 (multiple sclerosis) 和亚急性硬化性全脑炎 (subacute sclerosing panencephalitis) 的脑脊髓液中有抗 DNA 和抗 RNA 抗体^[23]。由于测定抗体方法简单、反应专一,所以已广泛应用,并且结合病理、临床指症来鉴别诊断混合结缔组织疾病 (MCTD)。

许多证据表明天然 DNA 和抗 DNA 抗体的免疫复合物是 SLE 并发肾小球肾炎的致病因子。Bankhurst 认为抗天然 DNA 抗体的出现是肾小球肾炎的开始,而可作预后的重要标志^[24]。Sontheimer^[25]发现伴有狼疮性肾炎的 SLE 病人血清中抗 dDNA 的主要成份是 IgG₁ 和 IgG₃。他认为可以用免疫球蛋白亚型 (subclasses) 的检测来预后 SLE 病人发展成肾炎的可能性。而 Homberg 却提出一旦 SLE 病人出现抗核糖核蛋白体抗体 (1% 发生率),都伴有肾炎并在 1~7 年死亡^[26]。

用核糖核蛋白体加佐剂免疫的动物,可发展成 Coombs 阳性溶血性贫血症、白细胞减少症、肝炎、心肌衰竭或脑炎,但都伴有肾炎,这些疾病在两年内可通过血清传递给正常兔子^[26]。虽然机理尚不清楚,但动物模型证实了抗核酸抗体产生,确和疾病发展密切相关,并可作为疾病诊断与预后的指针。

2. 其他自身免疫性疾病

越来越多地发现许多疾病与自身免疫相关。而抗核酸抗体也广泛存在于这些患者血清中。儿童期起病型糖尿病 (Juvenile-onset diabetes mellitus, JDM) 伴有多种自身免疫症状。病人血清中除了存在抗胰岛细胞抗体,还富有抗 sDNA、dRNA 和人工合成双链 RNA 的抗体,尤其,含高效价抗 dRNA 抗体的患者,一般都正处在糖尿病起病的时期。Huang 认为这些现象提供了一个信息,即:抗体对核酸的免疫反应,与糖尿病发展紧密相关,以及 RNA 病毒可能是这类糖尿病的病因^[27]。

慢性肠炎可诱发克隆氏病和慢性溃疡性结肠炎。患者的血清能与 dRNA、poly (rA)、poly(rA)·poly(rU) 结合,而不与 DNA 起免疫反应,病越重,抗 dRNA 抗体效价越高。DeHoratius 发现这些抗体也存在患者的未发病的配偶血清中,抗体发生率相似。结合电镜观察到活检标本中病毒颗粒的证据,他认为慢性结肠炎病人存在 RNA 病毒,并可传染给他的密切接触者;他认为可能由于失去了肠粘膜的完整性,因而肠系膜淋巴结暴露在包括病毒 RNA 为抗原的环境中,而发展成伴随自身免疫现象的克隆氏病和溃疡性结肠炎^[28]。

3. 病毒性疾病和寄生虫病

慢性活动性肝炎 (CAH) 与 SLE 相仿,广泛存在多种核酸抗体,包括抗 dDNA、sDNA、和核糖核蛋白体抗体。CAH 患者血清结合 dDNA 的能力高于原发胆汁性肝硬化,特别是 HBsAg 阳性的 CAH 结合能力更强,但抗体效价与 HBsAg 或核心抗体 (antiHBc) 效价无关。Jain 等认为,携带 HBsAg 的 CAH 如果对 dDNA 结合水平顽固地升高,则是一个不祥的预兆,可能会诱发成肝硬化^[29,41]。颇为重要的现象是血清中抗 sDNA 抗体效价明显增高是出现在血清转氨酶活力升高之前:对于甲型肝炎,在临床及生化指标出现前 1~2 星期,便可检测出血清中抗 sDNA 抗体;对于乙型肝炎,抗体效价升高是与 HBsAg 出现相一致或先于 HBsAg 出现,即在临床指征出现前几个星期;非甲非乙型肝炎情况也

相同。大部分 HBV 健康带毒者抗 sDNA 抗体呈阳性,而未感染的接触者与正常人相一致。因此测定抗 sDNA 抗体效价对于早期诊断肝炎是有用的^[30]。Gerber 检测到 CAH 中抗核糖核蛋白抗体效价远比其他各类肝病为高,CAH 中 HBsAg 阴性并伴有自身免疫症状的患者血清抗体效价最高^[31]。

Izui 观察到白血病人和淋巴瘤病人有高效价的抗 sDNA 抗体,并排除药物或接种牛痘等诱发可能性,认为抗体出现可能与血管或血管小球损伤相关^[5]。

非洲锥虫 (*trypanosoma*) 感染后死亡率很高。每只恒河猴静脉注射 5000 只锥体虫便很快致死。用锥体虫去感染恒河猴,在感染后第四周抗 sDNA 抗体达高峰,与肾活检测定肾小球肾炎发作时间一致。感染了锥体虫的患者血清中同样存在抗 sDNA 抗体。动物模型表明非洲锥体虫感染过程中,肾炎与抗核酸抗体生成相关,感染早期出现的抗体属 19S, IgG 抗体出现在感染后期^[32]。

动物实验中,百日咳杆菌、疟原虫等都可以在动物体内诱发抗 DNA 或抗 RNA 抗体。

4. 自发抗核酸抗体生成的可能因素

各类自身免疫性疾病,包括伴有自身免疫现象的病毒或寄生虫感染者血清中广泛存在多种自发性的抗核酸抗体。但对其自发生成原因说法不一。

Izui 观察到白血病患者在白细胞数下降时抗 sDNA 抗体效价升高,他认为由于细胞破坏, DNA 释放到环境中,机体对游离 DNA 产生抗体^[5]。而 Kinghan 认为 CAH 伴有抗 dDNA 抗体可能由于肝细胞损伤,释放出肝细胞核 DNA,而诱发抗 dDNA 抗体,也可能由于是肝脏病变阻止了 Kuffer 细胞吸收结合在内脏上的 DNA,而使组织暴露在 DNA 中,但是更可能是病毒 DNA 激发了抗体生成^[4]。一些实验似乎也支持病毒 DNA (或 RNA) 是抗体生成激发器的观点^[27,28]。

正常人血清中也存在低效价的抗 DNA 抗体, Rubin 证明了该抗体是人血清中正常成份——主要是 IgG,因而他认为,病患者血清中抗 DNA 抗体升高,是由于机体内预先就存在着能合成 DNA 抗体的 B 细胞,只不过在疾病发作时被大量增殖罢了^[3]。

四、抗核酸抗体的应用

1. 定性定量检测核酸和核酸组分

应用抗核酸抗体可以定性或定量检测正常细胞、病毒感染细胞、组织切片或抽提液中核酸或核酸组分的含量以及核酸类别,也可探测天然 DNA 受 X 射线辐射损伤的程度以及紫外光照等变性程度。由于抗原对抗核酸大分子抗体的免疫反应能力与本身分子量的大小有关,如变性 T₄ 噬菌体 DNA 对给定的抗血清,表现出明显的效价,经酶解或超声波处理之后,虽用同样血清也失去了固定补体能力。因此,免疫化学反应对测定核酸内切酶活力提供了非常灵敏的方法,它的灵敏度比检测酸溶性寡核苷酸方法提高了 200 倍^[33]。

抗体能特异地定向结合被修饰的碱基,利用免疫化学技术可以检出这些碱基和含有这些碱基的核酸分子。最显著的例子是 T₂、T₄ 和 T₆ 噬菌体 DNA 中含有葡萄糖碱基,用血清学方法可特异地测定在感染的 *E. Coli* 细胞中这些噬菌体 DNA 的合成,而不受

宿主 DNA 的干扰,即使宿主已先被 λ 噬菌体感染也无影响^[33]。第二信使 cAMP、cGMP 各能被专一抗体所识别,并互不交叉^[34],因此,可利用来测定它们的环化酶的活力,研究第二信使在信息传递中消长规律及各种试剂对第二信使的作用。如肾上腺素刺激肌肉 cGMP 水平升高,但不影响 cAMP 浓度。测定环化酶灵敏度可达 0.01~2 微微克分子,在反应中非环化核苷酸只占 0.005%,无明显干扰。

2. 核酸结构功能的研究

如果假定各种细胞内加工(如复制、转录、后转录和翻译)都与核酸组分更改有关,那末逻辑上可以推断这些组分和它们有关的抗体之间的相互作用将抑制或阻断这些加工过程。这样在抗体和包含相关半抗原的核酸之间的特异免疫反应,将提供一个有趣的和确切的数据,以认定半抗原成分的结构和功能。

1974~1975 年 Perry 等人确定了真核细胞 mRNA 5'端是 7-甲基鸟嘌呤 (m^7G) 与其他碱基组成 5'端帽子结构*。75 年 Both 发现去甲基或去帽子的 mRNA 丧失了与核糖核蛋白体 40S 亚基结合的能力,表明 5'端帽子提供了一个 mRNA 同核糖核蛋白体结合的识别标志。1976 年 Hickey、1978 年 Weber 观察到 5'端帽子类似物抑制 mRNA 的翻译能力。Munns 自 1977 年获得人工诱发抗甲基化核苷专一抗体之后,进一步应用抗 m^7G 抗体,几乎完全有效地抑制 chorin mRNA 的离体翻译能力,支持了上述的帽子结构的功能,并揭示帽子结构附近核苷酸顺序并未被抗体明显遮蔽^[35],表明抗 m^7G 抗体成功地成为特异位点的有效探针。在 mRNA 中大约每 500~1000 个碱基对含一个 m^6A ,尤其 5'端帽子往往都包含 m^6A 。目前好几个实验室对抗 A 抗体进行研究,期待着应用抗 m^6A 抗体提供 mRNA 中 m^6A 的生物学功能的证据。

近来化学方法特异地修饰核酸碱基为研究核酸结构功能提供了有效手段,如亚硫酸氨盐和间位甲羟胺作用于核酸碱基而不涉及超分子结构的形成。应用能识别被修饰了的碱基的抗体可以特异地分离到这部分核酸片断^[36],从而研究核酸的结构。同样原理也可利用免疫学和化学方法的结合以研究致癌剂对核酸的作用位点,进而探索致癌原理。Fuchs 获得专一抗致癌剂 AAFAF (N-acetoxy-N-2-acethylaminofluorene) 与 DNA 复合物的抗体(即:抗 DNA-AAFAF 抗体)通过抑制试验求得 Fab 对 dDNA-AAFAF 的结合常数与对 GMP-AAFAF 的相似,认为 AAFAF 作用点在 DNA 的 G 上^[37]。

3. 亚细胞结构的研究

由于血清学反应的条件包括温度、pH 和离子强度都是温和的,不会导致亚细胞结构的猛烈变化,因此在研究亚细胞结构方面往往可以提供一些其他技术很难提供的信息。利用抗核酸抗体的定性测定或定位标记,尤其结合抗蛋白抗体的应用,可以比较精确地描绘各种细胞器的结构和功能。

早在 1970 年 Stoll 就发现,能与天然 DNA 起反应的 SLE 血清也能与染色质起反应,但是需要 DNA 的量要比纯 DNA 多 20~50 倍,表明染色质上裸露的 DNA 只有

* 帽子结构为: $m^7G(5')\text{pppNmp}$ 或 $m^7G(5')\text{pppN'mpN''mp}$, 其中 $N'm$ 、 $N''m$ 代表任一 2'-O-甲基核苷。

2~5%。因此可以利用抗体测定 DNA 被组蛋白及其他蛋白质覆盖的程度。将组蛋白和 DNA 解离再重组以后 DNA 形成了双链,但这时却有 20% 的 DNA 裸露而可和抗 dDNA 抗体结合。如果人为地将 DNA 与组蛋白按 1:1 混合,则有 50% 的 DNA 与抗体起免疫反应,比起天然染色质, DNA 被覆盖比率大大下降了^[38]。利用抗 sDNA、抗 dDNA、抗 DNA-组蛋白以及抗核仁抗体,可以有趣地看到细胞核结构规律性的变化: dDNA 在 G 期接近核膜处出现, sDNA 只出现在 S 期,整个细胞周期都可观察到 DNA-组蛋白复合物,而核仁性抗原只在中期的细胞质方可检出到^[39]。

更多的工作是对染色体结构功能的研究。1974 年 Erlanger 就应用过氧化物酶标记抗核苷抗体,获得染色体的分带图谱^[40],可与瑞氏染色 (Gimsa 染色)分带技术相媲美。尤其可利用抗稀有碱基的抗体,鉴定某些特定的染色体。Lubit 观察到抗 5-甲基胞嘧啶核苷抗体标定在 1、9、15、16 及 Y 染色体上,各次实验同源同号染色体带谱一致^[41]。抗体染色的染色体图谱对于识别各对染色体,对于鉴别染色体的畸变:基因片段的易位、丢失、倒位和重复,似乎是一种很好的手段,这可能对于良种的育种、杂交后代的挑选,尤其对分子遗传病的判别和诊断提供简便、可靠的方法。

抗核酸抗体还可以应用到对染色体细微结构的研究,即可将这些细微结构放大到光学显微镜下可见,又可揭示它的化学本质。1972 年 Mace 等将染色体经 C-bands 技术处理后,与过氧化物酶标记的抗 sDNA 抗体相作用,发现染色体两臂处的 DNA 呈单链状态,着丝点部位仍为双链,而 Y 染色体全部呈单链。也发现卫星 DNA 总呈双链状态,可能由于卫星 DNA 具高度重复顺序在变化后又迅速恢复天然状态^[42]。虽然 1974 年就已在电镜中观察到人染色体的纤维结构和染色体之间结缔状连接,1976 年 Kanavama 等应用过氧化物酶标记抗 DNA 抗体去染色人染色体,首次在光学显微镜下清楚地显示了这些结构,并证明染色体之间的连接物含 DNA 组分^[43]。

应用抗核糖核蛋白体抗体的免疫学技术已成为研究真核细胞核糖核蛋白体及其亚基结构功能的重要手段^[44]。

4. 作为活性物质的专一抑制剂

许多蛋白或酶都能定向地与核酸结合而发挥它们的专一作用。利用抗核酸抗体对核酸的亲合力可以高效率地抑制这些活性物质的生物功能。同样也可以利用抗病毒、细菌、噬菌体的核酸抗体,抑制它们对宿主细胞的感染力。

为数不少的报道表明抗 DNA 抗体可以抑制 DNA 对 DNA 聚合酶和 RNA 聚合酶的模板活力。Wallace 发现抗鸟嘌呤核苷或抗胸腺嘧啶脱氧核苷抗体也抑制聚合酶活力,如果抗体和模板 DNA 预先保温则对酶活力的抑制率更高^[45]。也有报道抗嘌呤和抗核苷抗体能渗入海胆卵而干扰卵细胞的正常发育。在囊胚 (blastula) 阶段,短时期内暴露在 1:100 稀释的抗嘌呤血清中,卵细胞生长受阻;在原肠胚阶段,低浓度的抗体就能阻断胚胎发育。有时胚细胞能保持生命力 48 小时而不进一步分化^[46],说明抗体能通过屏障进入胚细胞发挥作用。这种观察对胚胎发育研究是极有用的。奇妙的是同样的抗体对哺乳类组织培养的细胞就不起任何影响。Timakov 报道抗变性 DNA 抗体能在原生质球形体上抑制单链 DNA ϕ 174 噬菌体的感染力^[47]。戴仁鸣等报道家蚕细胞质多角体病毒 (CPV) 经抗 CPV 抗体中和后感染力完全丧失,经抗水稻普通矮缩病毒 (RDV) (和 CPV

一样是双链 RNA 病毒)抗体中和后,CPV 感染活力降低二个数量级^[48]。十分清楚,这两类病毒的共同抗原是双链 RNA。有理由推测,利用专一抗核酸抗体可以诊断和防治动植物病毒病。

Mockanehko 等观察了带移植性 Sarcoma 45 肿瘤大鼠体内碘标记的抗 DNA 抗体(¹³¹I-Ig)的分布,发现¹³¹I-Ig 与单链 DNA 最活跃的结合是在 S 期,即 DNA 复制最旺盛时期。抗体能活跃地穿透细胞和复制基质(replicating matrix)相结合,同时也发现标记物集中在肿瘤组织的细胞核内,他认为,抗 sDNA 抗体进入肿瘤组织的作用看来可以抑制肿瘤细胞的增殖——抗 DNA 抗体在增殖组织的积聚可能抑制增殖过程^[49]。这种快速分裂的造血细胞可被抗 DNA 抗体抑制分裂,和分化现象相一致。

目前对小分子寡核苷酸或修饰过的单核苷酸兴趣日见浓厚。有证据表明它们中的一部分是基因表达的调控因子,如 pppA2'p5'A2'p5'A 抑制蛋白质生物合成^[50]。可指望在离体系统中,采用相关专一性抗体来研究这些因子的作用本质,成为探索基因调控的一种简便高效的方法。

五、展 望

对核酸免疫化学还有许多模糊不清的概念,各家说法不一。譬如:疾病中自发的抗核酸抗体是作为发病的病因还是发病的后果?——是自身免疫产生了抗自身核酸的抗体,或是机体对感染源中核酸产生了免疫反应,还是感染涉及了核酸免疫反应的“激发器”?^[3-5] 这些涉及了 SLE 等疾病防治的本质性问题,若得深入研究,将给人类带来幸福。

抗核酸抗体广泛存在于一些人类疾病患者血清中,它可以作为一种重要的免疫学工具,借以了解核酸的结构功能。然而,这种自身免疫抗体并未广泛用于这个目的。主要原因是因为免疫化学证据虽然指出这些血清是特异抗体的很好来源,但并未得到最终确认。并且对于研究某些特异抗体来说,无疑是太复杂了。另一方面,目前还未能获得纯净而具有免疫活力的核酸复合物(如核糖核蛋白体)。如能在技术上获得成功,则有可能利用专一抗体来比较复合抗原,从而描述该类核酸加工过程的不同步骤,并探测某些疾病病程中功能性障碍。

抗核酸抗体形成机制是极其复杂又令人困惑不解的。核酸,包括 DNA 顺序变化,以及 mRNA、rRNA 和 tRNA 在免疫球蛋白(抗体)生物合成过程中,各具有必不可少的重要作用;尤其免疫 RNA (iRNA)在抗体对蛋白质免疫反应中扮演了一个放大器和免疫信息传递者的角色。但是,核酸本身也具抗原性,能诱发机体产生专一抗体——免疫球蛋白。那末,各类核酸在抗本身的抗体生成过程中,它们的作用点、作用方式怎样?与抗蛋白质抗体生成有何不同?为什么合成系统的成分(核酸)受它们自己的合成产物(抗体——免疫球蛋白)的抑制;核酸的这种双重身份确实令人联想踟蹰。

对蛋白类抗原来说,个别氨基酸的置换可能引起整个蛋白分子免疫原性的改变,甚至可以从有免疫原性的决定簇变成免疫学上不活动的区域,而不能诱发针对该部位的抗体。而核酸抗原性既然不具种族特异性,又如何能在实验动物体内诱发出抗体,并广泛存在于患者血清中呢?可以设想对抗核酸抗体生成机制的认识,将可能对免疫反应的调节控制

等分子免疫学的重要理论引进全新的概念。

抗核酸抗体到底能否象识别蛋白质一级顺序一样识别核苷酸顺序? 至今仍是一个谜。从历史看,方法技术学上突破之后,理论研究紧接着便能开始开辟新的道路,建立新的概念。使用载体蛋白 MBSA,使半抗原——核酸诱发专一抗体成功,推动了对核酸抗原性研究的飞速进展。因此,有理由寄希望于今后能在免疫学方法、技术上有新的突破,以揭示目前被隐蔽的核酸的顺序决定簇。若确能如此,则将会给分子生物学和遗传学带来无限光明。我们可以应用专一抗体于跟踪重组核酸成分、检测基因融合水平、探明远缘杂交基因本质、诊断遗传疾病以及探索肿瘤发生原理等等重要方面。

参 考 文 献

- [1] Deicher, H. R. G. et al., *J. Exp. Med.*, 1959, 109, 97.
- [2] Plescia, O. T. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1965, 54, 1281.
- [3] Rubin, R. L. et al., *J. Immunology*, 1979, 122, 1604.
- [4] Kingham, J. G. C. et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 1978, 33, 204.
- [5] Izui, S. et al., *Schweiz. Med. Wochenschr.*, 1976, 106, 1377.
- [6] Poverenny, A. M. et al., *Immunochemistry*, 1973, 10, 577.
- [7] Guigues, M. & Leng, M. *Nucleic Acids Res.*, 1976, 3, 3337.
- [8] Aharonov, A. et al., *Eur. J. Biochem.*, 1974, 42, 73.
- [9] Khan, S. A. et al., *Nucleic Acids Res.*, 1977, 4, 2997.
- [10] Khan, S. A. et al., *ibid.*, 1977, 4, 3007.
- [11] Wakizaka, A. & Okuhara, E. *Tohoku J. Exp. Med.*, 1977, 122, 161.
- [12] Lamon, E. W. & Bennett, T. C. *Immunology*, 1970, 19, 439.
- [13] Guigues, M. & Leng, M. *Eur. J. Biochem.*, 1976, 69, 615.
- [14] Garcia-Ortigoza, E. et al., *Lancet*, 1975, 1(7903), 363.
- [15] Robbins, W. C. et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1957, 96, 575.
- [16] Depiante-Depauli, M. et al., *J. Immunol. Methods*, 1978, 22, 149.
- [17] Aarden, L. A. et al., *J. Immunol. Methods*, 1976, 10, 27.
- [18] Schuller, E. et al., *ibid.*, 1977, 14, 177.
- [19] Aarden, L. A. et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1975, 254, 505.
- [20] Tan, M. & Epstein, W. V. *J. Lab. Clin. Med.*, 1973, 81, 122.
- [21] Vladutiu, A. O. et al., *Clin. Chem.*, 1979, 25, 366.
- [22] 周康等,上海医学,待出版。
- [23] Schuller, E. et al., *J. Neurol. Sci.*, 1978, 37, 31.
- [24] Bankhurst, A. D. et al., *Int. J. Dermatol.*, 1976, 15, 203.
- [25] Sontheimer, R. D. et al., *Clin. Immunol. Immunopathology*, 1978, 10, 459.
- [26] Homberg, J. C. et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 1974, 17, 617.
- [27] Huang, S. W. et al., *Diabetes*, 1978, 27, 1105.
- [28] DeHoratius, R. J. et al., *Lancet*, 1978, 1(8074), 1116.
- [29] Jain, S. et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 1976, 26, 35.
- [30] Arquembourg, P. C. et al., *J. Med. Virol.*, 1978, 2, 359.
- [31] Gerber, M. A. et al., *Gastroenterology*, 1979, 76, 139.
- [32] Lindsley, H. B. et al., *J. Immunol.*, 1974, 113, 1921.
- [33] Stollar, D., *The Antigens*, 1973, I, p. 1, Sela, M. (ed.), Academic Press.
- [34] Steiner, A. L. et al., *J. Bio. Chem.*, 1972, 247, 1106.
- [35] Munns, T. W. et al., *Biochemistry*, 1979, 18, 3805.
- [36] Poverenny, A. M. et al., *Molecular Immunology*, 1979, 16, 313.
- [37] Fucks, R. P. P. et al., *FEBS (Lett)*, 1978, 92, 207.
- [38] Stollar, B. D. et al., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1970, 209, 541.
- [39] Tan, E. M. & Lerner, R. A. *J. Mol. Biol.*, 1972, 68, 107.
- [40] Schreck, R. R. et al., *Exp. Cell. Res.*, 1974, 88, 31.
- [41] Lubit, B. W. et al., *Exp. Cell. Res.*, 1974, 89, 426.
- [42] Mace, M. L. et al., *Exp. Cell. Res.*, 1972, 75, 521.
- [43] Kanavama, Y. et al., *Exp. Cell. Res.*, 1976, 103, 439.

- [44] Cavanagh, D. et al., *Analy. Biochem.*, 1977, **79**, 217.
- [45] Wallace, S. S. et al., *J. Mol. Biol.*, 1969, **43**, 41.
- [46] Rosenkrantz, H. S. et al., *Science*, 1964, **145**, 282.
- [47] Timakov, V. D. et al., *Nature (London)*, 1966, **212**, 695.
- [48] 戴仁鸣等: 生物化学与生物物理学报, 1979 **11**, 399.
- [49] Вопросы Медицинской ХИМИИ, 1976, **22**, 556.
- [50] Hovanessian, A. G. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1979, **76**, 3261.

酶免疫测定技术进展

林性玉 张惠珠

(上海第二医学院、上海免疫学研究所)

- | | |
|--------------------------|------------------|
| 一、引言 | 6. 戊二醛 |
| 二、常用交联剂的性能和应用 | 7. 苯醌 |
| 1. 对二氟间二硝基苯酚、氟尿酰氯、甲苯二异氰酸 | 三、几种检测酶活性的方法 |
| 2. 四重氮邻联大茴香胺 | 1. 荧光分光光度法 |
| 3. 水溶性碳二亚胺 | 2. 超敏酶放射免疫测定 |
| 4. N, N'-O-苯二马来酰亚胺 | 3. 光发射技术和化学光免疫测定 |
| 5. 过碘酸钠 | 4. 均相酶免疫测定 |

一、引言

从 Engvall 等^[1]于 1971 年提出用酶免疫测定法 (Enzyme Immunoassay 简称 EIA) 定量检测液体中大分子物质以来,由于这方法灵敏度高,试剂稳定,设备简单,操作安全等优点,已广泛地应用于基础医学研究及临床医学实践。例如早期用于寄生虫病、传染病等的诊断,流行病学调查及防治效果考核等方面^[2],近来又用于自身免疫性疾病的诊断^[3],体液中激素^[4]以及细菌性或病毒性传染病的抗原及抗体测定^[5]。但是在酶免疫测定中,一般常用分光光度法来检测酶的活性,因此其灵敏度往往比放射免疫测定 (RIA) 低。

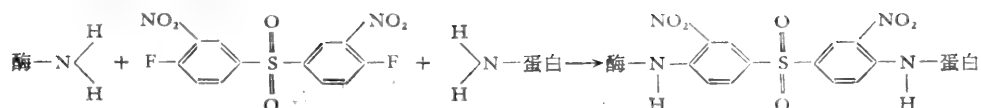
要提高 EIA 的灵敏度,主要从下列二方面来考虑: 可以从免疫学方面着手,提高抗原抗体反应的特异性及亲和力;亦可从生物化学方面来进行,设法制备较高活性的酶标抗体(原)及提高酶活性检测方法的灵敏度。本文重点介绍从生化角度在提高 EIA 灵敏度方面的工作近况。1. 比较几种常用的交联剂性能及应用概况。2. 介绍几种新的检测酶活性的方法。3. 介绍一种更简便的酶免疫测定方法——均相酶免疫测定。

二、常用交联剂的性能和应用

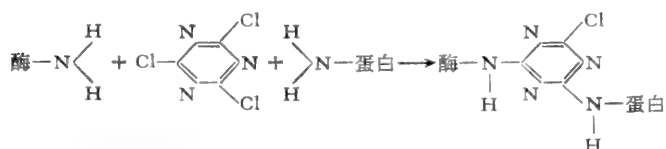
酶与抗体通过交联剂的作用相互连接。一般的化学交联剂多为双功能或多功能试剂。理想的交联反应是酶及抗体分子上被交联的基团不在它们各自的活性中心,就是说:在交联后各自的活性中心不受影响或影响很少。由于各种蛋白质结构不同,一些反应基团在蛋白质分子表面上的定位常不能确切了解;另外各种蛋白质能起反应的功能基团个数也不等。所以不同的酶与抗体和同一交联剂的反应结果不一样。因此怎样控制交联反应以获得高活性、均一的酶标蛋白质,目前还是经验式的。掌握各种交联剂的性能是得到理想结果的重要环节。

交联反应一般有二种进行方式:(1) 一步法。是将酶、抗体(原)及交联剂同时加在一起进行反应。由于酶及抗体(原)分子上功能基团与交联剂的反应率不同,因此一步法

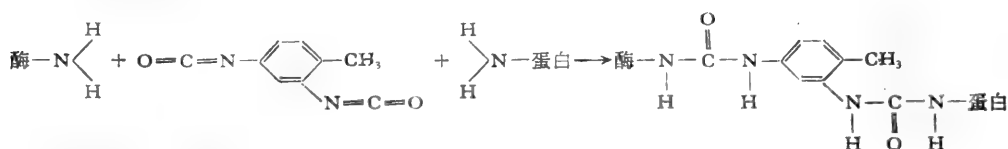
(1) 对二氟间二硝基苯磺



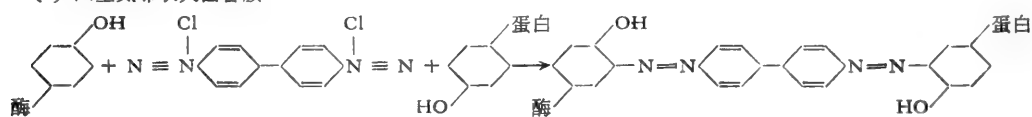
(2) 氰尿酸氯



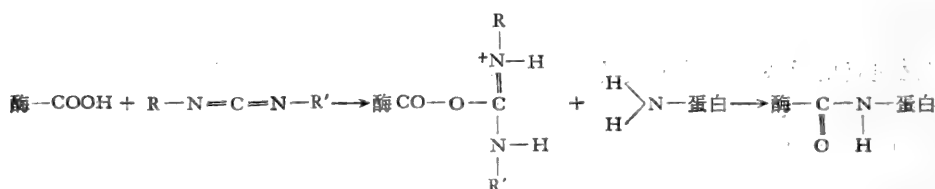
(3) 甲苯二异氰酸



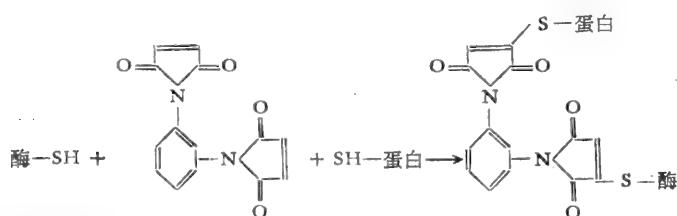
(4) 四重氮邻联大茴香胺



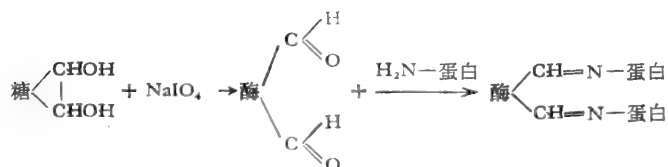
(5) 碳二亚胺



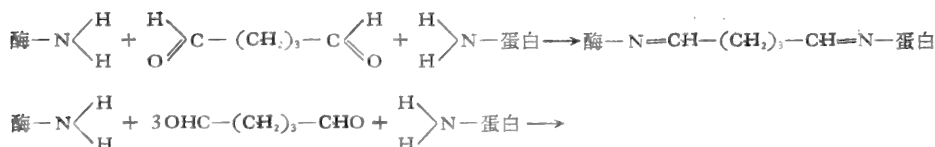
(6) N,N',-O-苯二马来酰亚胺

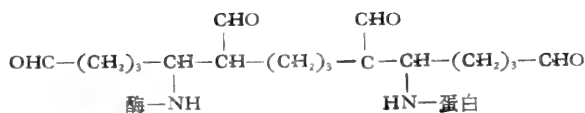


(7) 过碘酸钠



(8) 戊二醛





(9) 对苯醌

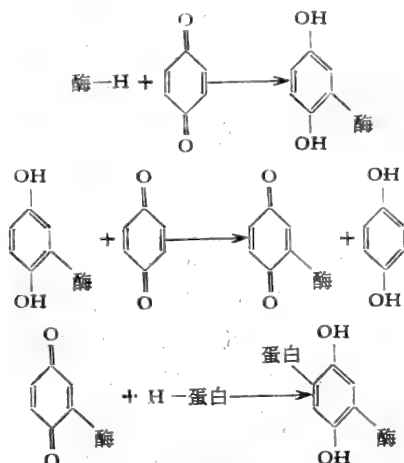


图1 交联反应的可能方式

很可能也造成酶本身或抗体(原)本身之间的交联聚合。这样获得的交联物往往不均一。(2)二步法。是使酶先与交联剂作用,去除过量的交联剂后,再使酶-交联剂与抗体(原)进一步反应。因此二步法对交联反应有所控制,交联产物的均一性可增加。理想的交联反应要求:(1)交联物得量高;(2)交联物比较均一,基本上是由一分子酶和一分子抗体(原)组成,它们仍然保持各自原有水平的生物活性;(3)交联物应稳定、不易失活。很显然,达到这样的效果决定于蛋白质的性质、交联剂的选择以及交联反应时的条件控制等方面。

目前常用的交联剂有下列几种:

1. 对二氟间二硝基苯磺、氰尿酸氯、甲苯二异氰酸

这三种试剂主要都是通过赖氨酸的 $\epsilon\text{-NH}_2$ 作用,使酶与抗体(原)交联^[6-8]。反应原理见图1(1)、(2)、(3)。但是这些试剂与蛋白质分子上的巯基及酪氨酸、组氨酸等残基上的具有活泼氢原子的功能基团也可进行反应,交联过程中很可能会影响某些酶的催化活性。此三种试剂都曾用于辣根过氧化物酶与抗体的交联,其交联物有效地用于酶免疫测定及酶免疫细胞化学测定。氰尿酸氯(Cyanuric chloride)还曾用在葡萄糖氧化酶及酸性磷酸酶与抗体的交联。由于这些交联剂与抗体分子上氨基的作用远远大于与酶分子上氨基的作用,所以酶标抗体得量低。曾试图用二步法以提高得量,但对二氟间二硝基苯磺(P,P'-Difluoro-m,m'-dinitrophenyl Sulfone)易分解,难以进行。甲苯二异氰酸(Toluene diisocyanate)的水解较慢,可利用二步法提高交联效率,使约10%辣根过氧化物酶交联到抗体上。值得注意的是这些试剂都是疏水性试剂,原先,它们都是溶解在有机溶剂中,当它们与蛋白质溶液反应时,这些试剂的活性基团可能与蛋白质的功能基团反应,亦可能本身被水解。从分子数来看,蛋白质溶液中水分子数目远远多于蛋白质的功能基团,所以试剂被水解的机会大于它的交联作用。与此同时,所得的交联物中亦含有大量疏水基,这些疏水基有增加交联物非特异吸附及储存时失活的趋势。

在一定条件下,氰尿酸氯可与多糖反应,所以可利用它作为制备多糖-酶的交联物。

2. 四重氮邻联大茴香胺

四重氮邻联大茴香胺(Tetra-azotized O-dianisidine)可用于许多酶与 IgG 的交联^[9],交联效果较好,酶标抗体的得量可达 20%。反应原理见图 1(4)。重氮盐主要作用于蛋白质分子上的组氨酸或酪氨酸,而这些氨基酸往往是酶的活性中心部分或近活性中心,因此用重氮盐进行交联常可导致酶的催化活性的降低。此外,重氮盐交联键不稳定,易被解离。

3. 水溶性碳二亚胺

水溶性碳二亚胺 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)(ECDI)及 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl) metho-p-toluenesulfonate (MCDI) 曾成功地用于制备大分子-大分子或大分子与半抗原衍生物的交联^[10,11]。例如辣根过氧化物酶及酸性磷酸酶与抗体(原)的交联。反应原理见图 1(5)。这种交联剂的缺点是交联产物不稳定,贮存几天后即失活。这可能是碳二亚胺可与蛋白质分子中的多个羧基作用,并且也可与蛋白质分子中其他功能基团进行反应,因此交联后的蛋白质分子的空间构象还有可能逐渐变化而丧失生物活性。

4. N,N'-O-苯二马来酰亚胺

近来此试剂用于 β -半乳糖苷酶与胰岛素及其他抗体的交联^[12,13],交联反应需要通过蛋白质分子上的巯基。用巯基琥珀酰化作用把—SH 引入胰岛素分子;通过巯基乙胺还原作用把—SH 引到抗体分子上。反应原理见图 1(6)。因为游离的—SH 基不稳定,易形成—S—S—键,此外,交联剂与—SH 基形成的键亦不稳定,所以所得的交联物是易变的。利用这方法可有 90% 以上的酶被交联到抗体上,但被交联的抗体量不稳定。有人认为抗体在马来酰亚胺作用下会首先形成二聚体或多聚体碎片,其中仅少部分与马来酰亚胺起化学反应。

5. 过碘酸钠

过碘酸钠(Sodium m-periodate)可用于含有糖链的酶与抗体的交联,因为糖链部分往往与酶活性无直接关系,因此可利用糖基与其他蛋白质进行交联^[14]。反应原理见图 1(7)。利用此试剂对辣根过氧化物酶与抗体交联时,交联效果好,得量高。交联物经凝胶过滤层析说明它亦是不均一的。不均一的原因可能是酶在过碘酸钠处理后,产生较多高活性醛基,其结果一方面由于活性醛基多提高了产量;另一方面可能本身相互作用产生醛醇缩合。交联物经鉴定其免疫活性为交联前的 17%,酶活性是交联前的 30%,酶和抗体的交联得量是 70—99%。我们将辣根过氧化物酶与羊(抗人 IgG) IgG 交联^[15],把氧化条件恒定在 30℃,氧化时间为 30 分钟,交联产物中的抗体活性是交联前的 60% 左右,酶活性是交联前的 50% 左右,所以过碘酸钠是 EIA 中较满意的一种交联剂。

6. 戊二醛

戊二醛(Glutaraldehyde)使蛋白质分子上的 ϵ -NH₂ 相互联接,反应的原理可能如图 1(8)。操作步骤有一步法及二步法^[16,17]。一步法的交联产物经凝胶过滤及超离心分

析指出它是不均一的,并且分子量大小相差悬殊。多数的酶与抗体经戊二醛处理后,找不到游离的抗体或酶。但在辣根过氧化物酶与抗体交联时,90%以上的酶仍是游离的。这可能是过氧化物酶具有很少的氨基,有些可能分布在酶分子内部,不易接近抗体,因而不能与抗体交联。戊二醛一步法比其他方法简单,条件温和,交联产物非常稳定,可贮存几年,已用于碱性磷酸酶、 β -D-半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶、乳酸脱氢酶、过氧化物酶、核糖核酸酶等的交联。不同的酶交联效果不一样。酶的交联量从5%(辣根过氧化物酶)—100%(乳酸过氧化物酶),酶的活性一般是交联前的60—70%。

用二步法所得的抗体-过氧化物酶交联物经分析表明其中90%以上是均一的,它由一分子酶和一分子抗体组成。3—5%过氧化物酶及40%的抗体或Fab被交联。交联后的酶活性为原来的50—75%^[18],抗体活性为原来的50%。二步法的酶标抗体得量稍低,但它是目前主要的能获得均一交联物的方法。均一的酶标抗体对直接测定结合在固相抗原上的抗体数目是很有用的。

7. 苯醌

苯醌(p-Benzoquinone)主要与蛋白质分子上的氨基及—SH基反应,并且可能与蛋白质及多糖分子上其他基团也有作用。交联反应的可能机制见图1(9)。曾利用苯醌成功地作为酶和含糖抗原的交联剂^[19,20]。用此法所获过氧化物酶标抗体,大多数是由一分子酶和一分子抗体组成。约60%的抗体,15%的过氧化物酶进行了交联。

以苯醌作交联剂,用二步法可获得各种蛋白质与酶的交联物,适用性很广。经苯醌处理的酶或抗体(原),其生物活性很少降低,但二者经交联后,交联物中酶或抗体的活性却有些丢失(最高达40%)。这可以用空间位阻效应来解释。也可能是在第一步中苯醌对蛋白质的激活作用是在pH6时进行,而去除过量苯醌后,第二步的交联是在pH8.2—8.5条件下进行。在蛋白质分子上可能还残留一些基团,在pH6时未曾作用,而在pH8.2—8.5时还可进行反应,这就引起更广泛的交联,继发引起活性的丢失。

以上列举了几种交联剂。除了交联剂不同可导致酶标抗体(原)性质上的区别外,当此酶标抗体(原)应用于不同方法时,其效果也不相同。在酶免疫测定时效果较好的交联物,若用于酶免疫组织化学就不一定同样敏感。例如由苯醌或戊二醛制备的交联物,在用于酶免疫组织化学法研究细胞内抗原定位时,二者都有效,并以苯醌法为好。但在酶免疫测定法中则以戊二醛法较为敏感。又如对碱性磷酸酶来说,用苯醌或戊二醛为交联剂都可得到相同的效果。这些说明在各种交联反应后所得到的各种酶标交联物的确切成分和结构还未完全清楚。目前还需根据实验目的来进行系统的实验,选择最适宜的交联剂及交联条件以获得较高活性的交联物。

三、几种检测酶活性的方法

在进行酶免疫测定工作时,除了交联剂外,对作为标记物的酶的选择同样是很重要的。与酶免疫组织化学测定一样,符合作为标记的酶应具有下列条件:(1)具有高度特异性及高转换率。可溶,并有一定稳定性。(2)具有一定个数和适宜排布的反应基团,通过这些基团形成的交联物,仍具有较高的酶活性。(3)有简单灵敏的检测方法。(4)有高度纯化的商品或易于制备。(5)在体液中浓度低,也不被体液中物质所抑制。

一般在酶免疫组织化学上可用的酶,都可用于酶免疫测定;但酶免疫测定与酶免疫组织化学测定不同,不存在酶标物必须通过细胞膜以接近抗原(体)的问题。因此即使大分子量的酶也可使用。如 β -D-半乳糖苷酶已用于酶免疫测定。几种常用作为标记的酶见下表:

几种常用作为标记的酶^[21]

酶	酶学委员会编号	来 源	分子量	被测物质
苹果酸脱氢酶	1.1.1.37	猪心线粒体	70,000	NADH
6-磷酸葡萄糖脱氢酶	1.1.1.49	肠系膜明串珠菌	102,000	NADPH
过氧化物酶	1.11.1.7	辣根	40,000	H ₂ O ₂ /色原
碱性磷酸酶	3.1.3.1	牛小肠	100,000	对硝基酚
外-1, 4- α -葡萄糖苷酶	3.2.1.3	niveus 根霉菌		葡萄糖
溶菌酶	3.2.1.17	鸡卵清	14,000	藤黄细球菌细胞壁碎片
β -D-半乳糖苷酶	3.2.1.23	大肠杆菌	518,000	邻硝基苯

根据实验目的及技术上的要求不同,使用酶标物时尚须考虑其他因素,如对检测酶活性时底物的选择。在酶免疫组织化学测定时,反应产物应是不溶性的,以便使它固定在组织细胞上;而在酶免疫测定法则要求反应产物完全溶解,以便定量。例如辣根过氧化物酶在用于免疫组织化学技术时,选择 3, 3'-二氨基联苯胺为底物,其反应产物不易溶解;而在酶免疫测定时,常用的底物有邻联大茴香胺及邻苯二胺。前者的氧化物在水溶液中不完全溶解,后者较理想,它的氧化物不仅溶解性好,而且灵敏度高,在作酶免疫测定时结果满意。邻苯二胺的缺点是对光敏感,因此在操作时要注意避光。

曾对辣根过氧化物酶、葡萄糖氧化酶、碱性磷酸酶及 β -D-半乳糖苷酶等与抗体的交联物作了比较^[22]。从准确性及重复性来看,碱性磷酸酶及 β -D-半乳糖苷酶最好。这主要是检测这二种酶活性时所用的底物溶解度好,反应产物稳定。碱性磷酸酶用对硝基苯磷酸盐作为底物, β -D-半乳糖苷酶用邻硝基苯 β -半乳糖苷作为底物。此外,这二种酶还可以利用新技术如荧光分析法来进行检测,使酶免疫测定技术的灵敏度大大提高。

1. 荧光分光光度法

Woolen^[23] 用荧光分光光度计测定 β -D-半乳糖苷酶的活性,所用的底物是致荧光物质 4-甲基伞形酸酐半乳糖苷 (4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside), 它可检查 1×10^{-1} mole 的 β -D-半乳糖苷酶。

Lidofsky^[24] 在美国第 179 次化学学会上报告用酶免疫测定法检测人血清中胰岛素含量,所用的酶是 β -D-半乳糖苷酶,而选择的底物本身不是荧光物质,但它的反应产物可被氩激光诱导而发射荧光。应用此方法可测得血清中胰岛素为 2.5 毫微克/毫升。

因 NADH 及 NADPH 具有天然荧光,因此一些以 NAD 及 NADP 为辅酶的脱氢酶,如苹果酸脱氢酶及 6-磷酸葡萄糖脱氢酶可通过荧光分析法来测定酶的活性^[28, 29]。其灵敏度比一般光吸收法可提高 2—3 个数量级。

2. 超敏酶放射免疫测定

Harris^[25] 报道了一种新技术称超敏酶放射免疫测定(Ultrasensitive enzymatic radioimmunoassay 简称 USERIA)。这方法的特点是它一方面利用酶的放大作用,即一个酶分子可对

大量底物进行反应,产生放大效应;另一方面用同位素方法检查酶反应的产物,使检测的灵敏度大为提高。利用这方法检查霍乱毒素及轮状病毒(Rotavirus),基本操作方法与酶免疫测定时一样,亦是微量平板法。所用的酶是碱性磷酸酶,底物是 ^3H 标记的 AMP (一磷酸腺苷)。最后用液闪烁计数器检查产生 ^3H 腺苷的生成量以表示酶活性的大小。USERIA 的灵敏度比 EIA 及 RIA 高 100—1000 倍。USERIA 检测碱性磷酸酶 (AKP) 量为 10^{-12} 毫克/毫升 (即 10^{-20} mole AKP); 检查霍乱毒素量为 10^{-16} 克 (即 600 个霍乱毒素分子)。由于这方法灵敏度高,可用来检查体液中一些微量生物活性物质,如激素、药物或某些致病因子。尤其是 ^3H 标记物与其他同位素比较,危险性较小。作者提出如果在底物方面进一步探讨,能找到一种 K_m 小而 V_{max} 较高的稳定的放射性底物,则 USERIA 的灵敏度还可以进一步提高。

3. 光发射技术和化学光免疫测定

Pauget^[26] 用光发射 (Light Emission) 技术可检查 10^{-15} 克辣根过氧化物酶。Velan^[27] 用化学光免疫测定 (Chemiluminescence immunoassay) 检测抗原。利用过氧化物酶催化 H_2O_2 氧化焦倍酚而产生发光物质,根据发射光强度的改变,求出抗原量,检测的灵敏度与 RIA 相近。

4. 均相酶免疫测定

均相酶免疫测定^[30] (Homogeneous Enzyme Immunoassay 简称 HEI, 又称为 Enzyme Multiplied Immunoassay Technique 简称 EMIT), 于 1972 年 Rubenstein 首先提出。它的基本原理是通过化学试剂将酶与抗原或半抗原进行交联,当特异抗体与这酶标抗原(半抗原)形成复合物后,酶的活性受到调节。可能是活性升高,也可能是活性降低。然后利用竞争原理对体液中未知的游离半抗原进行定量。目前此法已有效地用于小分子半抗原的定量^[31],大分子抗原的检测研究亦在活跃地开展中。反应原理的模式图见图 2。

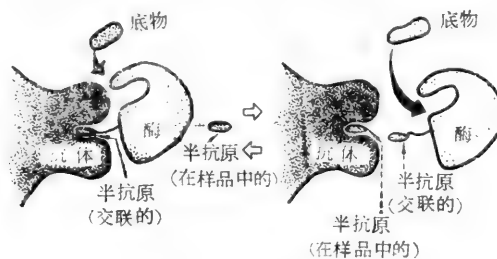


图 2 EMIT 反应原理的模式图

酶标半抗原和它的特异性抗体结合形成复合物。复合物中大分子抗体对酶分子施加影响,酶的活性中心被遮盖,底物不能接近酶分子,酶的活性被抑制。在此系统中若加入待测样品,它所含的游离半抗原就可竞争与特异抗体结合,把酶标半抗原从复合物中排除出去,酶的活性得到恢复。因此游离半抗原的浓度直接影响酶的活性。通过测定溶液中酶的活性变化就可对样品中半抗原进行定量。

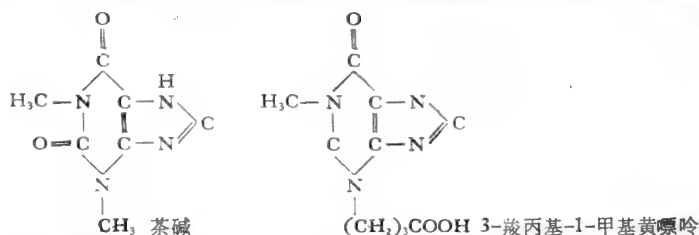
EMIT 操作包括三个步骤: (1)制备被测半抗原(一些小分子物质如药物、激素、代谢产物)的特异抗体。(2)把半抗原交联到酶分子上,形成酶标半抗原。在 EMIT 中,理想的酶标半抗原是既能保持半抗原的特异性与抗体结合,而抗体又可对酶的活性施加影响。因此酶及交联剂的选择都很重要。根据半抗原分子结构的不同,可采用不同的交联方

法。多数是将半抗原上的羧基(或引入羧基)与酶分子上的 ϵ -NH₂ 反应。具有有效羟基或多羟基的半抗原可利用半琥珀酸法或过碘酸钠氧化法与酶交联^[32]。目前所知适用于 EMIT 的酶有三种: 溶菌酶、苹果酸脱氢酶及 6-磷酸葡萄糖脱氢酶^[30,33,34]。选择这三种酶的理由很可能是半抗原与这三种酶的交联点是在酶的活性中心附近, 因此特异抗体有效地影响(阻碍)底物与酶的活性中心接近, 使酶的活性改变(下降)。(3)利用竞争法, 建立半抗原测试系统。

EMIT 与 RIA 或 EIA 测定方法不同。首先, 在 EIA 中酶标抗原与抗体结合形成复合物后, 酶的活性并无改变, 所以在测酶活性前需要把未结合的酶标抗原与结合在免疫复合物上的酶标抗原分离, 才能通过检测酶的活性求出抗体的量。因此 EIA 又称为非均相酶免疫测定法 (Heterogeneous enzyme immunoassay)。在 EMIT 中, 由于酶标半抗原与抗体结合成复合物后, 酶的活性产生改变, 因此在测定过程中, 不需将未结合的酶标半抗原和免疫复合物分离。只需在测定系统中检测加入抗体及样品前后酶活性的差别, 就能对样品中游离半抗原进行定量。因此 EMIT 更简洁, 无两相抗原之分, 故称为均相酶免疫测定法。

EMIT 已成功的用于小分子化合物的测定, 尤其是测定某些药物在血清中浓度例如对治疗药物的监护方面发挥了很大的作用。这方法只需微量样品(血清 50 微升), 用自动化分析仪一分钟之内即可完成测定, 为临床医生提供了快速的信息。在研究药物动力学方面 EMIT 更是有力的武器, 利用它来检测血液中外源性药物及内源性物质, 例如, 抗癫痫药、抗哮喘药、强心药、抗菌素、抗肿瘤药及甲状腺素 T₄ 等^[35]。亦有助于检查尿中排出药物, 例如对吗啡、美散痛、巴比妥盐等的监测, 检查有否滥用^[36,37]。

茶碱 (Theophylline) 是常用的抗哮喘药, 控制症状时血清中茶碱最适浓度是 10—20 微克/毫升, 但茶碱在每个个体内代谢率及排泄率不同。因此在应用茶碱病人的血清中, 茶碱的浓度可以差异很大。过少不能抑制症状; 过多可产生中毒副反应。对一个急症哮喘患者, 检查血液中茶碱含量是很需要的。1977 年 Gushaw 建立用 EMIT 方法检查血中茶碱的浓度^[38], 其步骤如下: 把茶碱的衍生物 3-羧丙基-1-甲基黄嘌呤连接在牛 γ -球蛋白上使具有免疫原性, 用之免疫羊, 以取得抗体。将茶碱衍生物交联到 6-磷酸葡萄糖



脱氢酶上, 形成酶标茶碱。在测试系统中加入待测病人血清(含游离茶碱)、特异抗体, 同时加入底物 G6P 及 NAD。在加入酶标茶碱后, 反应液中游离茶碱与酶标茶碱竞争和抗体结合位点结合。若样品中游离茶碱含量高, 则结合到抗体上的酶标茶碱相对较少, 而未结合的酶标茶碱就残留较多。由于酶标茶碱与抗体结合后, 6-磷酸葡萄糖脱氢酶的活性被抑制, 所以酶标茶碱残留得多, 则酶的活性就较大。这样的结果表明酶的活性直接与样品中游离茶碱含量相关。用分光光度计于 340nm 测定 NADH 形成的初速度表示酶的活性, 从标准曲线就可求出样品中茶碱含量。曾对方法的重复性进行了考核, 其变异系数 < 10%。

在 EMIT 中,亦有抗体与酶标半抗原形成复合物后,酶的活性不是被抑制,而是被激活的现象。甲状腺素 T_4 的测定就是一例。Ullman 等^[39]曾利用 EMIT 测定甲状腺素 T_4 。苹果酸脱氢酶 (MDH) 与 T_4 的衍生物交联后,MDH 的活性受到强烈的抑制, K_m 增加,活性降低 90% 以上。当加入 T_4 特异抗体后,MDH- T_4 衍生物与抗体结合形成复合物。这时,结合在复合物上的 MDH 活性却得到恢复(激活)。反应的模式图见图 3。如果在测试系统中加入含 T_4 的病人血清(游离 T_4),这种游离 T_4 与 MDH- T_4 衍生物竞争与抗体结合,这样就降低了抗体对 MDH- T_4 衍生物的诱导激活作用。利用这关系,通过测定 MDH 活性,可对病人血清中 T_4 进行定量。关于 MDH 与 T_4 衍生物交联后酶活性明显的降低而抗体却促使酶活性恢复的原因,Ullman 认为 T_4 衍生物与 MDH 交联时,除了与 MDH 的亚基有共价连接外,还可能有较弱的非共价键连接于酶表面的非催化位点上,这种连接使酶变为相对无活性的构象。而 T_4 抗体有阻止非共价键形成的作用,因此 MDH- T_4 衍生物与抗体结合后酶可以转变为有活性的构象。

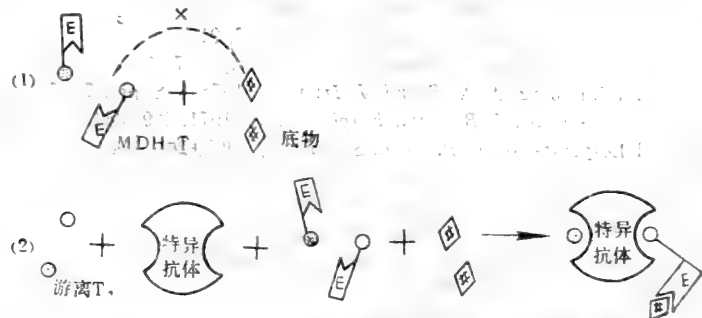


图 3 利用 EMIT 测定血清中 T_4 的反应模式图

- (1) MDH 与 T_4 交联后,底物不能进入酶的活性中心,MDH 活性被抑制。
- (2) 在反应系统中加入待测血清(含游离 T_4)、特异抗体、MDH- T_4 及底物。游离 T_4 就和 MDH- T_4 竞争与抗体结合。当 MDH- T_4 与抗体结合后,由于抗体对 MDH- T_4 的诱导激活作用,酶的活性得到恢复。所以通过测定 MDH 活性的改变,对血清中 T_4 定量。

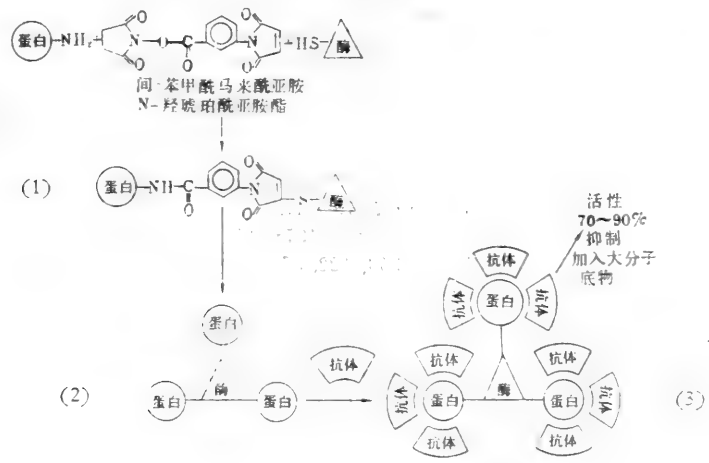


图 4 利用 EMIT 对大分子物质进行测定的原理

最近 J. Y. Chang 正在探索用 EMIT 来测定血清中的 IgG (私人通讯)。其基本点与测定小分子半抗原一样。但酶和蛋白质之间的交联和所用的酶的底物有所不同。

Chang 等的实验设计原理是用间-苯甲酰马来酰亚胺 N-羧琥珀酰亚胺酯 (meta-maleimido-benzoyl N-hydroxysuccinimide ester) 将蛋白质与 β -半乳糖苷酶交联, 见图 4(1)。交联时适当地调节待测蛋白质与酶的用量, 以获得最适的酶/蛋白比值的交联物见图 4(2)。当这种交联物与该蛋白质的特异抗体混合时, 就可形成庞大的抗原抗体复合物见图 4(3)。在这复合物中酶的活性是否受到影响与底物的大小及复合物的状态有关。如果加入很大的底物分子 (自身相互交联的邻硝基苯半乳糖苷 (orthonitrophenylgalactoside) 进行酶活性测定时, 由于底物分子庞大, 不能接近酶分子, 表现出酶的活性被抑制。这种由于与抗体结合而引起酶活性的抑制作用是这种测定方法的依据。

EMIT 的操作简单、反应灵敏, 优点较多, 不仅适用于体液中药物的测定, 还可以扩展到各种中间代谢产物的测定以及大分子的测定, 其发展前途是宽阔的。

参 考 文 献

- [1] Engvall, E. and Perlmann, P., *Immunochemistry*, 1971, 8, 871.
- [2] Voller, A. et al., *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1976, 70, 98.
- [3] Pesce, A. J. et al., *Scand. J. Immunol.*, 1978, 8, Suppl. 7, 91.
- [4] Van Weemen, B. K. et al., *Scand. J. Immunol.*, 1978, 8, Suppl. 7, 73.
- [5] Carlsson, H. E. and Lindberg, A. A., *Scand. J. Immunol.*, 1978, 8, Suppl. 7, 97.
- [6] Modesto, R. R. and Pesce, A., *J. Biochim. Biophys. Acta*, 1971, 229, 384.
- [7] Avrameas, S. and Lospinat, G., *C. R. Acad. Sci. Paris*, 1967, 265, 1149.
- [8] Modesto, R. R. and Pesce, A., *J. Biochim. Biophys. Acta*, 1973, 295, 283.
- [9] Avrameas, S., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1968, 50, 1169.
- [10] Clyne, D. et al., *J. Histochem. Cytochem.*, 1973, 21, 233.
- [11] Nakane, P. K. et al., *J. Histochem. Cytochem.*, 1966, 14, 789.
- [12] Kato, K. et al., *J. Biochem.*, 1975, 78, 235.
- [13] Kato, K. et al., *J. Immunol.*, 1976, 116, 1554.
- [14] Nakane, P. A. and Kawoi, A., *J. Histochem. Cytochem.*, 1974, 22, 1084.
- [15] 林性玉等: 临床免疫及实验免疫, 1980, 1(4), 38.
- [16] Avrameas, S., *Immunochemistry*, 1969, 5, 43.
- [17] Avrameas, S. and Ternynck, T., *Immunochemistry*, 1971, 8, 1175.
- [18] Boersma, D. M. and Streefkerk, J. G., *J. Histochem. Cytochem.*, 1976, 24, 481.
- [19] Ternynck, T. and Avrameas, S., *Ann. Immunol.*, (Inst. Pasteur), 1976, 127, C. 197.
- [20] Ternynck, T. and Avrameas, S., *Immunochemistry*, 1977, 14, 767.
- [21] Sharpe, S. L. et al., *Clin. Chem.*, 1976, 22(6), 733.
- [22] Guesdon, J. L. and Avrameas, S., *Immunochemistry*, 1977, 14, 443.
- [23] Woolen, J. W. and Walker, P. G., *Clin. Chim. Acta*, 1965, 12, 647.
- [24] Lidofsky, S., Presented at the American Chemical Society's 179th National Meeting. Mar. 1980. *Abstracts, Chem. and Eng. News*, 1980, 3.
- [25] Harris, C. C. et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 1979, 76(10), 5336.
- [26] Pauget, K. et al., *Anal. Biochem.*, 1977, 79, 447.
- [27] Velan, B. and Halmann, M., *Immunochemistry*, 1978, 15, 331.
- [28] Lowry, O. H. et al., *J. Biol. Chem.*, 1956, 222, 97.
- [29] Guilbault, G. G. et al., *Anal. Chem.*, 1965, 37, 1219.
- [30] Rubenstein, K. E., et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1972, 47, 846.
- [31] Bastiani, R. J. et al., *Amer. J. Med. Technology*, 1973, 39(6), 211.
- [32] Erlanger, B. F., *Pharmacological Reviews*, 1973, 25(4), 271.
- [33] Rowley, G. L. et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1972, 47, 864.
- [34] Rowley, G. L. et al., Presented at the 172nd American Chemical Society National Meeting. San Francisco, 29 Aug. 1976. *Abstracts, Biol.*, 151.
- [35] Rubenstein, K. E., *Scand. J. Immunol.*, 1978, 8, Suppl. 7, 57.
- [36] Mule, S. J. et al., *Clin. Chem.*, 1974, 20, 243.
- [37] Schneider, R. S. et al., *Clin. Chem.*, 1973, 19, 821.
- [38] Gushawk, J. B. et al., *Clin. Chem.*, 1977, 23, 114.
- [39] Ullman, E. F. et al., *Clin. Chem.*, 1975, 21, 1011.

甾体激素的放射免疫测定

丁 震 朱忠义

(上海市内分泌研究所)

- | | |
|---------------|---------------|
| 一、引言 | 5. 抗原、抗体纯度的影响 |
| 二、甾体免疫原的制备 | 五、甾体标记物 |
| 1. 甾体激素衍生物的制备 | 六、实验条件及样品处理 |
| 2. 甾体蛋白结合物的制备 | 1. 试验的缓冲液 |
| 三、抗血清(抗体)的特性 | 2. 反应的温度和时间 |
| 1. 亲和力 | 3. B、F 分离方法 |
| 2. 效价 | 4. 样品预处理 |
| 3. 特异性 | 七、方法学鉴定 |
| 四、影响抗体特性的因素 | 1. 准确性 |
| 1. 免疫方法的影响 | 2. 灵敏度 |
| 2. 载体蛋白的影响 | 3. 精密度或重复性 |
| 3. 分子比率的影响 | 4. 特异性 |
| 4. 免疫原结构的影响 | 八、结束语 |

一、引 言

甾体激素(即类固醇激素)是由肾上腺及性腺分泌的一类参与机体新陈代谢和维持正常生命活动的重要物质。极微量的激素能发挥强大的生物效应。它们作用于靶细胞的细胞核,控制脱氧核糖核酸的转录过程,直接影响蛋白质的生物合成,在体内起着重要的生理作用。在生物体液中甾体激素的浓度都很低(10^{-12} — 10^{-9} 克/每毫升血浆),所以对甾体激素的定量一直是困难的。长期以来缺乏有效的微量测定方法,成为研究甾体激素的主要障碍,40年代采用了一些生物测定方法,由于这类方法灵敏度低、特异性差,有极大的局限性;50年代发展了化学方法和荧光方法;60年代又有了气相层析,双标记同位素衍生物等方法,灵敏度、准确性有了很大提高,为甾体激素的研究提供了新的方法。但這些方法仍有缺陷,对某些激素的定量仍较困难。免疫技术发展以后,特别是70年代放射免疫分析技术在甾体激素测定中的广泛应用,使甾体分析工作的状况为之一新。由于方法灵敏度高,特异性强,目前对几乎所有甾体激素都可定量测定,灵敏度达到 10^{-12} 克水平。成为基础、临床和内分泌研究中不可缺少的重要工具。

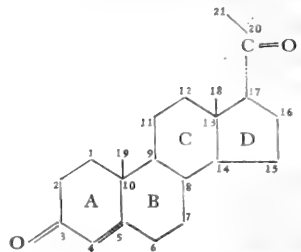
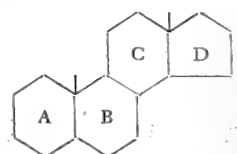
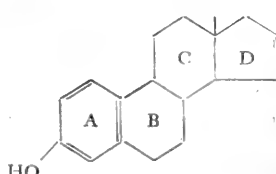
甾体放射免疫测定原理是,基于抗原的半抗原决定簇同抗体的抗体结合部位之间的可逆反应,在此反应系统中,标记抗原(标记甾体)与非标记抗原(非标记甾体或被测样品)对特异抗体之间的竞争结合,构成一定的函数关系。根据剂量反应曲线,可计算被测样品的含量。整个放射免疫测定过程可概括下面几个步骤:(1)免疫原(抗原)制备,(2)抗血清(抗体)制备,(3)被测激素的标记,(4)放射免疫反应,(5)抗原-抗体结合物(B)与游离抗原(F)的分离。

本文将对甾体放射免疫测定中上述一些有关问题作一综述。

二、甾体免疫原的制备

甾体激素都是分子量低于 400 的小分子物质。本身不具有免疫性，不能直接用来免疫动物产生抗体。但当它们通过化学途径共价结合到大分子载体蛋白上，就具有免疫性。这类小分子物质，称为半抗原 (Hapten)。甾体激素都属于半抗原。其基本结构和特性，列表 1。

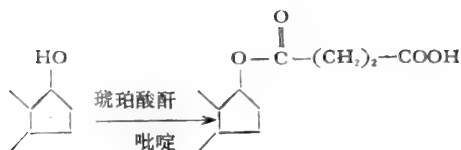
表 1 甾体激素结构和特性

激素名称	英 文 名	简写	化学结构和特点	生理属性
皮质醇	Cortisol	F	 <p>环戊烷多氢菲骨架，具有 21 个碳原子，C-3, C-20 上是酮基；C-4, C-5 之间是双键</p>	皮质激素
皮质酮	Corticosterone	B		
11-脱氧	11-Deoxycortisol	S		
皮质醇	11-Deoxycorticosterone	DOC		
皮质酮	Aldosterone	Aldo		
17-羟孕酮	17-Hydroxyprogesterone	17-OHP	孕激素	孕激素
孕酮	progesterone	P		
睾酮	Testosterone	T	 <p>具有 19 个碳原子，C-17 位上是羟基或酮基。</p>	雄激素
双氢睾酮	Dihydrotestosterone	DHT		
雄酮	Androsterone	A		
脱氢异雄酮	Dehydroisoandrosterone	DHA		
Δ^4 -雄烯二酮	Androstenedione	Δ^4 -dione		
雌酮	Estrone	E ₁	 <p>具有 18 个碳原子 A 环为苯酚</p>	雌激素
雌二醇	Estradiol	E ₂		
雌三醇	Estriol	E ₃		

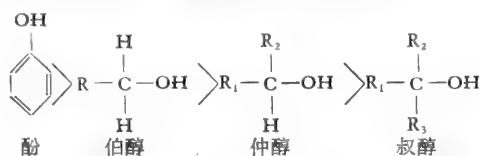
制备甾体免疫原的工作早在 50 年代就开始^[1-4]，至今已发展了很多方法。甾体激素结合到载体蛋白分子上可分两步进行：(1) 甾体激素衍生物的制备；(2) 甾体衍生物同载体蛋白的共价结合。

1. 甾体激素衍生物的制备

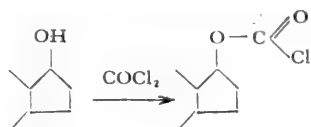
天然的甾体激素都含有羟基或酮基，根据这二种基团，就可以有选择地制备甾体激素衍生物。甾体分子上的羟基与琥珀酸酐在吡啶中反应，可得到琥珀酸甾体化合物^[1,5-8]。



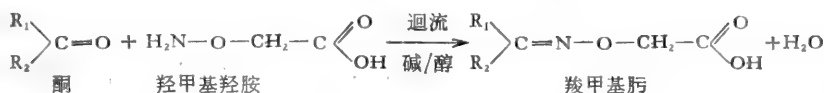
由于甾体分子上的羟基的部位不同,它们的化学活泼性也不同。通过控制反应时间、温度和试剂浓度等条件,可以对不同位上的羟基进行选择性的酯化作用^[5]。如: 17 β -雌二醇含有二个羟基,一个在 C-3 位上是个酚式羟基;另一个 C-17 位上是个仲醇。若在室温(25 $^{\circ}$ C)反应 5 分钟,就有 55—80% C-3 酯化的雌二醇(E₂-3-monosuccinate)产生。延长反应时间,就逐渐形成 C-3, C-17 双酯雌二醇(E₂-3, 17-disuccinate)。反应持续三天,则在层析谱上只发现雌二醇-3,17-二琥珀酸一种衍生物。叔醇的酯化更困难,反应所需时间更长。要加快叔醇的酯化速度,可用对甲苯磺酸代替吡啶,回流反应几个小时即可。几种羟基的活泼性顺序是: 酚羟基>伯醇>仲醇>叔醇。



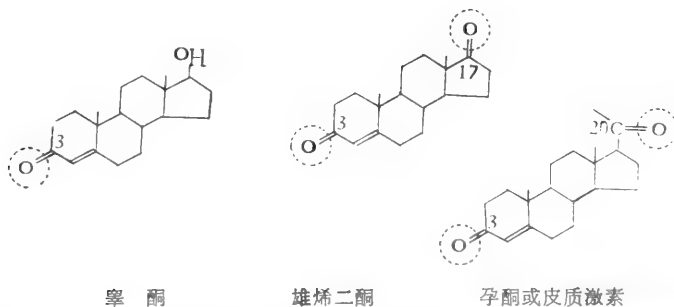
甾体羟基还可通过光气(COCl₂)形成氯甲酸酯衍生物^[1,6]。



甾体分子上的酮基与羧甲基羟胺(Carboxymethylhydroxylamine)作用,可产生甾体羧甲基肟衍生物^[1,2,6,9,10]。羧甲基羟胺一般是盐酸盐,所以反应需要在碱性条件下进行。可用碱性醇溶液或吡啶作溶剂,回流 1—2 小时即可完成反应。



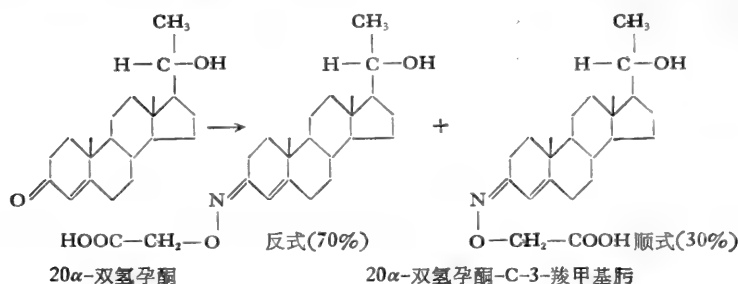
酮与羧甲基羟胺反应程度,取决于酮基附近碳原子的饱和情况, α - β -未饱和的酮基较 α - β -饱和的酮基更易起反应^[5]。如: Δ^4 -3-酮基比雄烯二酮中的 17-酮和孕酮分子及皮质激素中的 20-酮基更活泼。



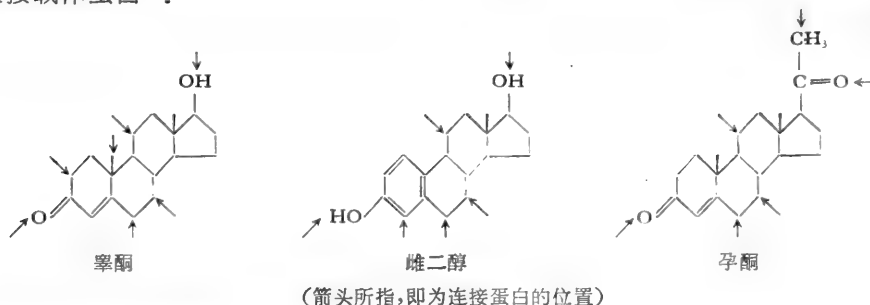
根据酮基的这个化学特性,对含有二个酮基的甾体激素,可以选择性地在 C-3 酮基

制备甾的衍生物,只要改变反应温度,减低试剂浓度,使反应在温和条件下进行即可。雄烯二酮与等克分子的羧甲基羟胺在吡啶溶液中, 37℃ 反应 3 小时,就有 50% 生成 C-3 甾衍生物。我们实验室在制备醛固酮的 C-3 甾衍生物时,采用室温 (25℃) 搅拌反应 2 小时,这样作用时间短,条件比较温和,约有 80% 是醛固酮-C-3-甾; 20% 是醛固酮-C-3,20-二甾。用纸层析分离 (溶媒系统, 甲苯:醋酸乙酯:甲醇:水=9:1:5:5), 醛固酮 $R_f = 0.43$; 醛固酮-C-3-甾的 $R_f = 0.02$; 醛固酮-C-3, 20-二甾的 $R_f = 0.26^{[10]}$ 。

由于在羧甲基甾结构中, C=N 是双键, 不能自由转动,所以在立体构象中有顺式和反式二种。在制备 20 α -双氢孕酮的羧甲基甾化合物时,有 30% 是顺式构型,70% 是反式构型:



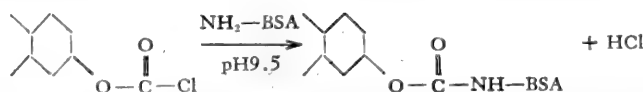
以上用琥珀酸或羧甲基羟胺制备甾体衍生物,目的是在甾体分子上引进一个羧基 ($-\text{COOH}$),以便与载体蛋白上主要是赖氨酸的氨基 ($-\text{NH}_2$) 相联接。其缺点是甾体分子上原有的羟基或酮基就此被占有,而这些羟基或酮基可能就是某些甾体激素分子中具有特殊生理作用的功能基团。为了保持原有的羟基或酮基也可通过别的途径,在甾体分子的其他部位引进羧基^[11-23],如(1)在 C-11 位上 α -羟化后,再进行琥珀酸酯化(例:孕酮-11 α -半琥珀酸的制备)^[22,24]。(2)B 环 C-6 氧化成酮基,再生成 C-6 羧甲基甾(例: E_1 , E_2 , E_3 的 C-6-羧甲基甾的制备)^[25-27] (3) C-6 用 N-溴代琥珀酰亚胺 (NBS) 溴化后,形成硫醚烷酸衍生物 (Thioether alkanic acid derivatives)^[20,21]。(4)制备甾体硫酸盐、甾体-葡萄糖苷酸和甾体-羧甲基衍生物^[6,14, 28]。(5)用甾体分子间支链断裂互变等方式制备甾体衍生物(例: 11 α -皮质醇断裂 C-20,21 支链制备甾酮-11 α -半琥珀酸; 11 α -羟雌酮转变成雌二醇-11 α -半琥珀酸等^[6,16])。因此,甾体激素,可以根据需要,在不同部位,制备不同形式的甾体衍生物,再同蛋白连接。若以甾酮、雌二醇、孕酮为例,就有很多部位可以联接载体蛋白^[6]:



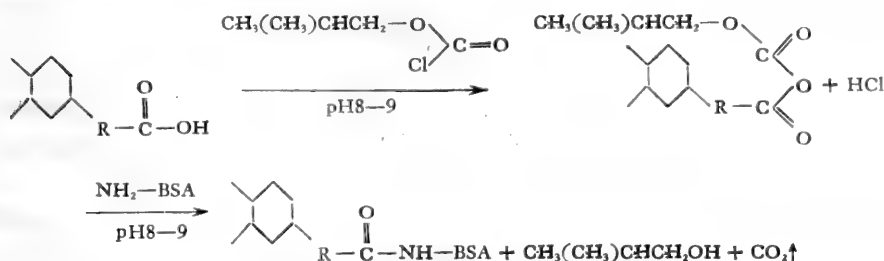
2. 甾体蛋白结合物的制备

甾体激素衍生物与载体蛋白之间的连接有下面三种方法^[1,2,29-31]。

(1) **Schotten-Bauman 反应:** 甾体的氯甲酸酯在碱性条件下能与蛋白氨基形成肽键。

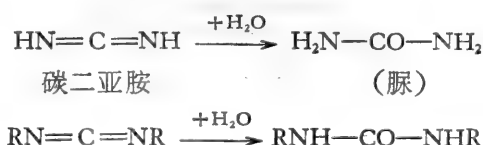


(2) **混合酸酐法:** 含有羧基的甾体衍生物与氯甲酸异丁酯形成混合酸酐，再在碱性条件下与蛋白分子中氨基结合。



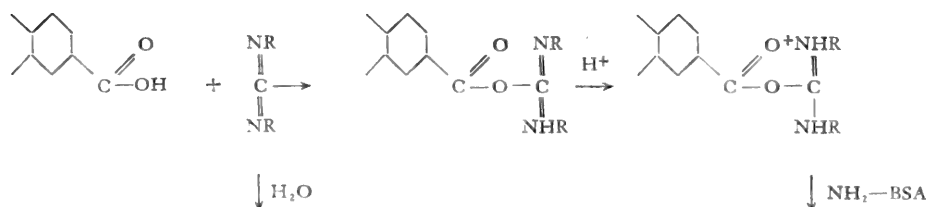
反应分两步进行。形成混合酸酐必须在无水条件下进行。甾体衍生物与氯甲酸酯在无水溶剂中，加叔碱去除盐酸而形成混合酸酐，这步反应只要在低温（5℃）进行几分钟（20—30 分钟）即可。酸酐在低温是相当稳定的。经常被采用的几种氯甲酸酯和叔碱是，氯甲酸异丁酯、苯氯甲酸酯、辛基氯甲酸酯；三正丁胺、三正丙胺、三乙胺及 N-乙基六氢吡啶（N-ethylpiperidine）等。第二步，酸酐与载体蛋白上赖氨酸的 ε-氨基作用后就分解，形成肽键。因蛋白不能溶于无水溶剂，故这步反应需要相当量的水存在，因此两步反应所用溶剂必须能互溶。这就限制了第一步形成酸酐的反应溶剂只能是一些亲水溶剂，如，二氧六环、四氢呋喃、二甲基甲酰胺等。当二氧六环作为溶剂时，温度不能低于 10℃。因为溶剂易结晶。蛋白溶液在加入混合酸酐反应液时，溶液产生混浊，可用 NaOH 来调节 pH 至 8—9，使溶液变清。这步反应需在 4℃ 搅拌 4—10 小时。

(3) **碳二亚胺方法:** 用碳二亚胺作为缩合剂，是合成多肽的一种经典方法，也可用于制备甾体免疫原。未被取代的碳二亚胺，可以看作是一个无水脒，当碳二亚胺溶于水就会形成脒：

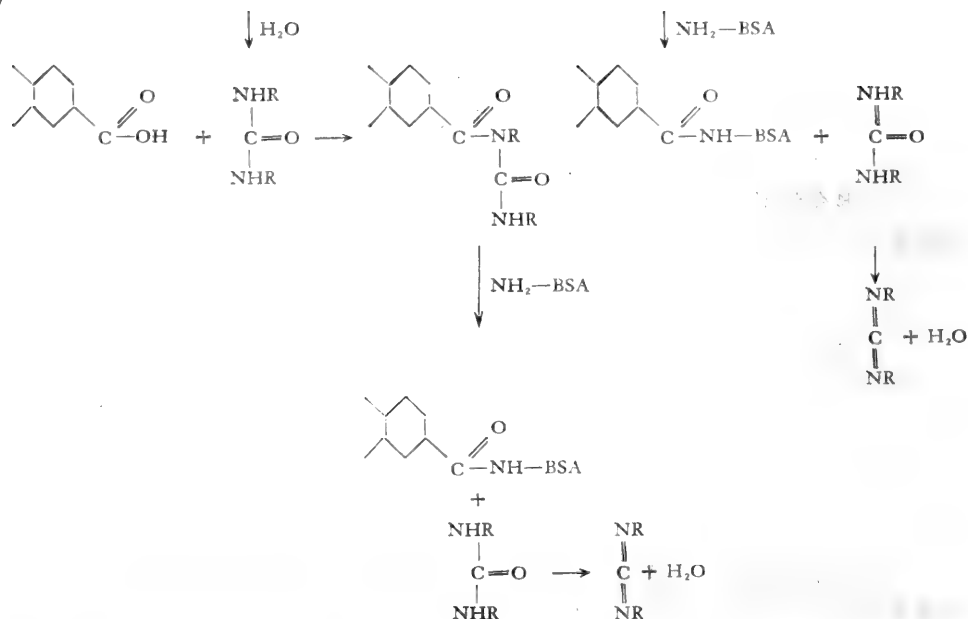


用碳二亚胺法来制备甾体-蛋白结合物，其反应机制尚不清楚，可能有以下二种方式：

(i)



(ii)



大家比较一致的看法是第一种方式。常用的碳二亚胺有：

HN=C=NH, 碳二亚胺；

$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{N}=\text{C}=\text{N}-\text{C}_6\text{H}_{11}$, 二环己基碳二亚胺 Dicyclohexylcarbodiimide (DCC)；

$\text{CH}_3\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}=\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2 \text{Cl}^-$, 1-乙基-3-(3)-二甲基-氨基丙基碳二亚胺
1-Ethyl-3-(3)-DiMethyl-aminopropyl Carbodiimide (EDC)；

$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{N}=\text{C}=\text{N}-(\text{CH}_2)_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)\text{C}_4\text{H}_8\text{O} \text{SO}_3^-$, 1-环己基-3-(2-吗啉基-(4)-乙基)-碳二亚胺-间-对甲苯磺酸盐
1-cyclohexyl-3-(2-morpholino-(4)-ethyl)-Carbodiimide meta-p-toluene Sulphonate (CMC)

表 2 几种甾体免疫原及其抗体特性

激素名称	免疫原(甾体-蛋白结合物)型式*	S/P**	抗血清编号	滴度	K值(L/M)
睾酮	T-C-3-Oxime-BSA	35	R-3*4	1:50,000	0.44×10^{10}
皮质醇	F-C-21-Suc-BSA	21	R-7*5	1:4,000	0.50×10^9
醛固酮	Aldo-C-3-Oxime-BSA	26	R-10*7	1:20,000	0.37×10^{10}
雌二醇	E ₂ -C-6-Oxime-BSA	17	R-16*7	1:60,000	2.8×10^{10}
雌三醇	E ₃ -C-6-Oxime-BSA	24	R-8*4	1:40,000	—
雌酮	E ₁ -C-3-Suc-BSA	—	R-43*2	1:80,000	5.3×10^{10}
皮质酮	B-C-3-Oxime-BSA	—	R-14*7	1:4,000	0.38×10^9
双氢睾酮	DHT-C-3-Oxime-BSA	—	R-62*2	1:120,000	6.2×10^{10}
脱氢异雄酮	DHA-C-3-Suc-BSA	—	R-65*1	1:40,000	0.57×10^{10}
11-脱氧皮质醇	S-C-21-Suc-BSA	—	R-35*2	1:20,000	0.43×10^{10}
孕酮	P-C-112-Suc-BSA	—	R-87*6	1:50,000	—

* T-C-3-Oxime-BSA 即睾酮-C-3-肟-牛血清白蛋白； F-C-21-Suc-BSA 即皮质醇-C-21-半琥珀酸-牛血清白蛋白,其他雷同。 **S/P 代表甾体分子与蛋白分子的比例,也即表示每个蛋白分子上联接的甾体分子数。

以上三种方法,以混合酸酐法及碳二亚胺法比较常用。我们曾用混合酸酐法制备了几种甾体-蛋白结合物^[8,10,27,30],见表2。这种方法稳定性好,容易控制,制得的免疫原中半抗原(甾体)对蛋白的分子比率较高。这些抗原容易得到抗体。碳二亚胺法的主要特点是,反应可在水溶液中进行,条件比较温和,不易引起蛋白变性。但碳二亚胺类物质很易潮解,在反应过程中,蛋白分子也可能相互缩合,减低了溶解度,致使反应透析液中往往有沉淀产生。我们实验室主要采用混合酸酐法。

三、抗血清(抗体)的特性

抗血清是免疫分析技术中最重要的试剂。抗血清的特性,表现在它对抗原的亲合力、效价、特异性三个方面。

1. 亲合力

亲合力反映了抗原-抗体结合的程度。亲合力大,在反应时结合速率就快,解离度小。结合强度可以用抗原-抗体反应中平衡常数 K 值来表示。在放射免疫测定中, K 值又称亲和常数。根据质量作用定律^[32-35]:



$$K = [PQ]/[P][Q], K^* = [P^*Q]/[P^*][Q], \text{而 } K = K^*$$

$$\text{非标记抗原总量 } p = [P] + [PQ], \text{标记抗原总量 } p^* = [P^*] + [P^*Q]$$

$$\text{抗体总量 } q = [Q] + [PQ] + [P^*Q]$$

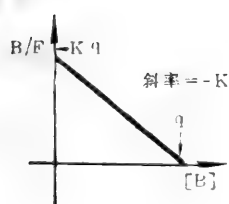
$$\text{抗体结合抗原总量 } [B] = [PQ] + [P^*Q], \text{游离抗原总量 } [F] = [P] + [P^*]$$

$$\text{二者之和 } [T] = [B] + [F] = p + p^*$$

$$B/F = \frac{[PQ]}{[P]} = \frac{[P^*Q]}{[P^*]} = \frac{[PQ] + [P^*Q]}{[P] + [P^*]}$$

$$B/T = \frac{[PQ]}{[P] + [PQ]} = \frac{[P^*Q]}{[P^*] + [P^*Q]} = \frac{[PQ] + [P^*Q]}{[P] + [P^*] + [PQ] + [P^*Q]}$$

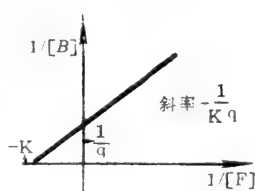
根据上述几式,经换算后可导出下列几种计算亲和常数(K 值)的方程和图解:



①

(1) Scatchard 图

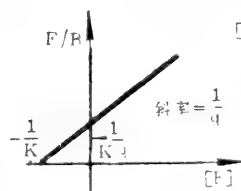
$$B/F = K[q - (B)]$$



②

(2) Lineweaver-Burk 图

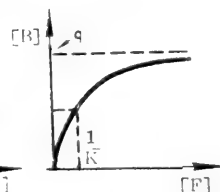
$$1/[B] = \frac{1}{q} + \frac{1}{Kq} \cdot \frac{1}{[F]}$$



③

(3) Eadie 图

$$F/B = \frac{1}{Kq} + \frac{1}{q} [F]$$



④

(4) Michaelis-Menten 图

$$[B] = \frac{K [F]}{1 + K [F]} \cdot q$$

由于甾体抗血清的非均一性,它含有各种不同浓度,不同亲和力和不同特异性的多种免疫球蛋白,因此整个抗血清的亲合常数是平均值^[5]。所以实际得到的 Scatchard 图往往不是一条直线。从上述计算亲和常数的方程,可进一步明确 K 值的意义及 B/F 、 $[P]$ 、 $[Q]$ 三者之间的关系,在相同条件下,一个具有较高亲和力(K 值)的抗血清,在反应到达平衡状态时将具有较高的 B/F 值(或 B 值),产生较多的抗原-抗体结合物,而游离抗原浓度就较低,所需的抗体总浓度也可较小(即可以使用更高稀释的抗血清)。所以,要求有高亲和力的抗血清,在放射免疫分析中是很重要的。

2. 效价

抗血清的效价是免疫反应液中所使用抗血清的最终稀释度来表示,稀释倍数越高,就表示抗血清效价越高。确定一个抗血清的效价,可以将这个抗血清按不同程度稀释与一定量的标记抗原,在规定的缓冲液体积和反应的温度及时间内进行免疫反应,取其结合率在 50% 左右的抗血清最终稀释度作为该抗血清的效价^[5,36,37]。抗血清效价与抗体的亲和力有关,具有高亲和力的抗血清在相同条件下有较高的效价。因为 K 的单位是 L/M ,而“ M/L ”表示浓度,所以其倒数“ L/M ”也可用来表示稀释度,因此 K 值含义是:一个克分子量($1M$)的抗体需要稀释到几升(L/M)才能使 50% 的标记抗原结合到抗体-抗原结合物中去。当结合率为 50% 时, $[PQ] = [P]$, 则 $K = \frac{1}{[Q]}$, 因为 $[Q] = [q] - [PQ]$, 所

以当 $[P] \rightarrow 0$ 时则 $[q] - [PQ] \rightarrow [q]$, 即 $[Q] = [q]$, 所以 $K = \frac{1}{[q]}$, 若 K 越大, 则

所需抗体总浓度 $[q]$ 越小(即效价越大)。若要比几个抗血清之间的效价, 则进行试验的条件都必须相同, 包括标记抗原用量, 反应液体积, 试验所用的缓冲液, 反应的温度和时间以及 B , F 分离的方法都必须一致^[5], 因为这些因素都会影响 K 值从而影响效价。

3. 特异性

抗血清的特异性在放射免疫分析中尤为重要。有了高度特异的抗血清, 将大大简化样品的处理过程和免疫测定程序。所谓抗血清的特异性是指抗血清同其抗原结合能力与其他类似物结合能力的比较。如抗血清与相应抗原(Y)的结合能力越强, 而与其类似物 $[Z]$ 结合能力越弱, 则特异性就越强。检验某种抗血清的特异性, 可用该抗血清与其类似物抗原的交叉反应比值来表示。理论上, Z 对 Y 的交叉反应可用抗体对这二个激素的亲合力的比率来表示, 交叉反应 $= \frac{K_Y}{K_Z}$ ^[38,39]。而事实上, 在样品中(特别在未经抽提的

人血浆中) Z 对 Y 的交叉能力, 还要受到其他结合蛋白和其他交叉激素以及异种抗体等多种因素的影响^[39]。因此抗体的真实特异性和测得的特异性之间是有差别的。所以利用对某一抗体的交叉能力, 来直接测定或计算该物质的含量, 可能不够妥当。测定交叉反应的程度, 通常是比较二种抗原(Y 和 Z)所建立的标准曲线, Z 对 Y 的交叉力, 可用下列三种方法求得^[40](见图 1)。

(1) 50% 置换法 (50% D 法) 就是用置换 50% 标记抗原 Y^* , 所需要的二种抗原量的比来表示, 交叉反应 $= Y_{50}/Z_{50} \times 100$ 这个方法是最常用的, 缺点是它在低抗原浓度

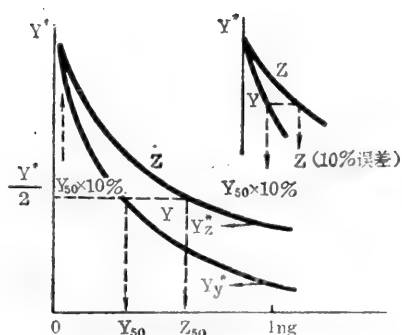


图1 Z对Y交叉反应试验的测量方法

小范围内来计算交叉反应,低估了实验误差。

(2) CR1ng 方法 即用1毫微克二种抗原(Y和Z)置换标记抗原Y*的比率来表示,交叉反应 = $\frac{Y^* - Y_Z^*}{Y^* - Y_Y^*} \times 100$ 在某些情况下,这种方法比较可靠地估计了实验误差,但是1毫微克是个任意确定的数值,往往不符合实验的实际情况。

(3) 10% 误差方法 是用二条标准曲线的最初梯度之比来表示,交叉反应 = $\frac{Y_{50} \times \frac{1}{100}}{Z(10\% \text{ 误差})} \times 100$ 这种计算方法,认为比较接近真实情况,因为它考虑了交叉反应中应接受的误差。但是这种方法目前还用得较少。

上面已述,特异性受多种因素的影响,因此用这些方法测得的交叉力是个相对的近似值,因方法不同,就有不同的结果,见表3^[40]。

表3 二种方法计算交叉反应结果的比较

激素名称	交叉激素名称	交叉反应程度(%)	
		50%D 法	CR1ng 法
5α-双氢睾酮	5α-雄烷-3α-17β-二醇	0.5	14
	5α-雄烷-3β-17β-二醇	0.4	20
	雄烯二酮	3	24
11-酮-睾酮	睾酮	3.4	33
	5β-雄烷-3α-17β-二醇-11 酮	6	25
睾 酮	异睾酮	0.6	6
	5α-双氢睾酮	3.2	27
皮 质 醇	皮质素	3.0	24
	11-脱氧皮质醇	27	32

四、影响抗体特性的因素

1. 免疫方法的影响

免疫动物的方法不同对产生抗体的成功率和快慢有影响。Abraham 的报告指出^[5], 免疫时间过短,抗体效价不高;免疫时间过长(超过8个月),抗体对半抗原的特异性有下

降趋势(见图2)。所以以6—8个月为最佳。我们免疫时间一般是4~6个月在这阶段效价接近高峰。近年来普遍采用的小剂量背部多点皮内注射免疫法,成功率较大,产生抗

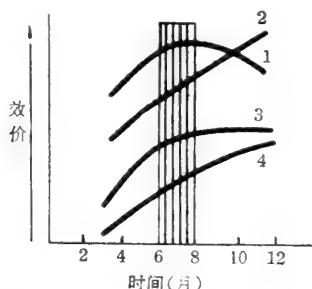


图2 免疫时间对抗体效价、亲和力,特异性的影响。

1 甾体连接部位特异性, 2 蛋白引出的特异性, 3 效价, 4 亲和力。

体的时间也较快^[4]。Nieschlog^[6]曾用7种不同甾体免疫原,免疫了128只兔子,采用一次多点皮内注射法,结果有95%产生抗体,5%(6只兔子)没有抗体,免疫1~2个月后,抗体效价达到高峰。并有些抗体可以维持几个月甚至超过一年或更长时间,仍有较高的效价。我们也曾用T-3-BSA, E₂-6-BSA, F-21-BSA三种免疫原作了小剂量(30—60μg)一次免疫法试验,结果在2个月后就都产生了不同效价的抗体(F1:4000, E₂1:8000; T1:20000)^[42]。

2. 载体蛋白的影响

几乎所有蛋白质都可作为半抗原结合的载体。最常用的是动物的血清白蛋白,如人、牛、猪、兔等血清白蛋白的制品,市上经常有供应,其优点是对有机溶剂和化学条件引起的变性作用较小,形成的结合物易溶解。曾有人认为^[43],利用免疫动物同种蛋白则动物只对半抗原部分产生特异抗体,而对蛋白质部分不产生抗体,抗体特异性可能较强;另一种意见是,当利用与免疫动物不同种属的蛋白时由于蛋白质部分的免疫源性较强,导致动物对半抗原部分也容易产生抗体。1973年Walkar等^[44],用E₂-6-酮连接多聚赖氨酸、BSA、RSA三种抗原作比较,结果E₂-6-BSA抗原产生的抗体,其滴度、特异性最好。一般最常用的载体蛋白是BSA和HSA。也可用牛γ-球蛋白或人γ-球蛋白作为载体蛋白。

3. 分子比率的影响

每个蛋白质分子上联结半抗原分子的数目,对诱发抗体的产生有一定影响。Niswender等^[45]观察到分子比率(即半抗原分子/蛋白分子的比)在20或更多些,产生的抗体效价高,如果低于10,则抗体效价就较低。有报道指出^[5],分子比率在20或更多些,则免疫三个月,一般效价均在1:1000以上,如果低于20就不易产生抗体,或效价很低。根据我们的经验(见表2),分子比率低于20也能产生高质量的抗体。分子比率与效价没有绝对平行的关系。但是分子比率在20以上的成功率较高,这是一般公认的看法。

4. 免疫原结构的影响

半抗原-蛋白结合物(甾体免疫原)诱发的抗体对半抗原的特异性(专一性)与半抗原分子上的结合位置有关, Landsteiner发现^[46],游离的半抗原对抗体的特异性,主要取决于半抗原的关键化学基团要远离与载体蛋白的结合点。同时发现,半抗原要与载体蛋白处于相对突出的地位,如此所得到的抗血清,其特异性要比分子连接点相同、但是中间连接的“化学桥”短的甾体-蛋白结合物的抗血清特异性要高^[40]。在甾体抗血清中,甾体突出于(远离)蛋白的部分特异性好,而甾体靠近蛋白的部分特异性差^[5,45]。例:Δ⁴-3-酮C₁₉的甾体,在A环C-3位上连接载体蛋白,产生的抗血清对比较突出于蛋白的D环特异性好,而对于靠近蛋白的A环特异性差。因此,对相应的5α-C₁₉甾体有明显的交叉作用,而对

Δ^4 -3-酮 C_{21} 甾体不起明显的交叉作用。

可以认为,甾体-蛋白结合物有三个组成部分:载体蛋白、“桥架”、甾体,(见图3)。它所引出的抗体包含有各种不同“识别”能力的组分,而我们所需要的则是能对甾体结构有细加识别的那部分能力。为此目的,在制备甾体免疫原时,通过适当的“化学桥”,使甾体伸出蛋白分子表面,暴露清楚,就可以增加抗体对半抗原的识别能力(即特异性)。“化学桥”的长度最好是4—6个碳原子,过分长也不能进一步提高特异性^[47]。羧甲基胍(=N—O—CH₂—COOH),半琥珀酸(—OOC—CH₂—CH₂—COOH)就是能符合增强抗体特异性容易与蛋白连接的两种“化学桥”^[40]。甾体激素都具有环戊烷多氢菲的“基架”,而在四个环及支链上则拥有各种不同化学基团。这些化学基团的不同,使甾体激素具有不同的生物特性。即使是微小的改变,如:羟与酮,17 α -羟与17 β -羟, α - β -未饱和酮与 α - β -饱和的酮等等,就能产生重要的生理作用的改变^[5]。因此在制备抗原时,需要使半抗原上的主要功能基团不被占用,并远离结合点,以免被遮盖,使它们更能发挥抗原决定簇的作用。从下面几个表(4—6)中可以看出:同一个甾体激素,因其与蛋白结合的部位不同,所产生的抗血清特异性就有很大差别^[47-50]。

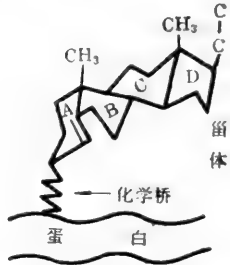


图3 甾体-蛋白结合物示意图

表4 三种不同结构甾酮抗原所产生抗血清特异性的比较

激素名称	T-17	T-3	T-11*
睾酮	100	100	100
双氢睾酮		77	31
雄烷二醇	0.01	26	1.1
雄烯二酮	30	0.2	0.2
脱氢异雄酮	1	0.5	0.02
脱氧皮质酮	55	0.3	<0.01
孕酮	94	0.04	<0.01
雌二醇	0.01	0.04	<0.01

* T-17, T-3, T-11 表示睾酮分别在 C-17, 3, 11 部位连接蛋白所制成的抗原。表格中数字、表示对睾酮抗血清的相对结合力,表 5、6 以下也类同。

表5 不同结构雌二醇抗原对抗体特异性的影响

激素名称	E ₂ -17	E ₂ -3	E ₂ -11	E ₂ -6
17 β -雌二醇	100	100	100	100
雌酮	96	67	3	1.2
17 α -雌二醇	47	30	1	0.7
雌三醇	10	22	3	0.9
睾酮	0.1	0.1	0.1	0.1

从表4、5、6中看到,睾酮 C-11 连接的免疫原(T-11-BSA)特异性较好,因为它不占用睾酮分子上的化学基团。睾酮是 Δ^4 -3-酮-17 羟的 C_{19} 甾体化合物,在 C-3, C-17 上都有它的功能基团,特别是 C-17 β 上的羟基,所以 T-17 和 T-3 都各占用了一

表 6 不同结构孕酮抗原对抗体特异性的影响

激素名称	P-3	P-6 α	P-6 β	P-7 α	P-11 α	P-20
孕 酮	100	100	100	100	100	100
17-羟孕酮	4.6	0.26	0.32	15	1.2	98
5 α -孕烷二酮	61	27	30	11	13	46
5 β -孕烷二酮	—	—	52	2	—	—
脱氧皮质酮	16	0.15	0.17	7	0.7	96
皮 质 酮	0.02	<0.01	<0.01	—	<0.01	0.4
睾 酮	0.05	0.003	0.003	<0.01	<0.01	95
雌 二 醇	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.04

个化学基团,特异性就差。双氢睾酮与睾酮的分子结构很相近,用 T-3-BSA 作抗原产生的抗体对双氢睾酮的交叉就很大。T-17 抗原因 C-17 上羟基被占用,使抗体对 D 环特异性减弱,因此对 D 环上持有不同功能基团的孕酮和脱氧皮质酮就不能很好识别,特异性很差,所以孕酮和脱氧皮质酮对睾酮的交叉就很大,分别是 94% 和 55%。雌二醇也有类似情况,因为三个雌激素(E_1 , E_2 , E_3)分子的区别,仅在于 C-17, C-3, C-16 α 上羟基或酮基,因此占用 E_2 分子上的 C-3 或 C-17 基团,则抗体特异性就较差,与 E_1 , E_3 的交叉就很大;而 C-6, C-11 的抗原特异性就较好,因为它们不影响 E_2 分子上的功能基团。此外,我们也看到,17 α - E_2 和 17 β - E_2 , 同样是 C-17 上的羟基,因所处分子立体构型不同,对抗体的特异性也有明显差别。表 6 中孕酮情况也是一样。根据抗原结构和抗体特性的这种关系,就可以选择适当部位有意识地制备高特异性的抗体,也可以制备低特异性的抗体。如:用 S-21-BSA 抗原产生的抗体,对 17-OHP 有 100% 的交叉^[51],因此这种抗体即能测定 S,又能测定 17-OHP。

5. 抗原、抗体纯度的影响

作为免疫原物质,不一定需要很纯,但是提高免疫原的纯度,可以增加抗体的效价和特异性^[52]。我们曾用 DHT 抗原作比较,经过用醋酸纤维薄膜电泳纯化后的 DHT 抗原,产生的抗血清效价比原来未经纯化的大 10 倍,特异性也有改善^[53]。其他抗体经过亲和层析等方法纯化后,也可提高抗体的亲和力和特异性。

五、甾体标记物

用于甾体放射免疫分析的标记物,常用的有³H 及 ¹²⁵I 二种标记物。³H 标记的甾体化合物其比放射性强(以下均简称 SA)在 25 到 100 居里/毫克分子之间,¹²⁵I 标记甾体的 SA 在 2200—4400 居里/毫克分子之间(见表 7^[36])。因此¹²⁵I 标记物可得到更高的效价和灵敏度。理论上用¹²⁵I 标记物作放射免疫测定灵敏度比³H 标记物可大 50 倍,但实际上得到的灵敏度范围与³H 标记物相差不多。标记甾体衍生物其结构比标记甾体更接近免疫原(抗原),因此抗血清对它就有更高的亲和力和效价^[6](见图 4、5 和表 8)。

因为甾体抗血清都是由甾体衍生物连接在蛋白赖氨酸残基上作为免疫原而制得的,所以³H-T-3-oxime-Lysine 的结构与免疫原更相近似,对抗体就有更高的效价和亲和力(见图 5,表 8),³H-T-3-oxime 较差,而³H-T 则更差。碘标甾体,一般采用碘标酪氨酸

表 7 二种同位素特性

同 位 素	标记 原子数	每分子 馏体	SA 居里/毫克分子	半 寿 期	射 线
^3H	1		30	12.26 年	β^-
	2		60		
	4		120		
^{125}I	1		2200	60.2 天	γ, X
	2		4400		

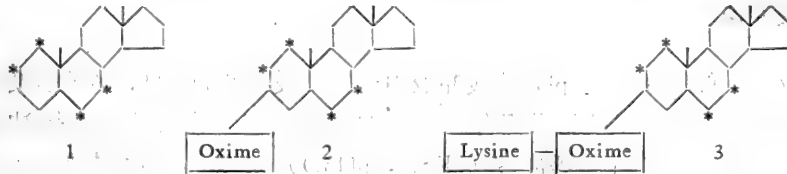


图 4 三种标记物的图解结构

(1) [1, 2, 6, 7- ^3H]-睾酮; (2) [1, 2, 6, 7- ^3H]-睾酮-3-肟; (3) [1, 2, 6, 7- ^3H]-睾酮-3-肟-6-赖氨酸

表 8 几种抗原的亲合力

抗 原	亲 和 常 数 K
T	$0.31 \times 10^9 \text{L/M}$
T-3-Oxime	$1.61 \times 10^9 \text{L/M}$
T-3-Ox-lysine	$5.95 \times 10^9 \text{L/M}$
T-3-HSA	17.0(每分子 T0.85)
(20 分子 T)	

甲酯 (TME) 的馏体衍生物作为标记物^[6,51],但庞大的甲酯基团妨碍抗体同 TME-馏体之间的接近,减低了亲和力,从而影响了试验的灵敏度和特异性。用酪胺 (Tyramine) 或组胺 (Histamine) 代替 TME,能改善试验的灵敏度和特异性^[5,6]。但碘标 TME 方法仍被广泛采用。也有人试图用碘标全抗原上蛋白的方式(因为蛋白质分子中含有酪氨酸和组氨酸基团)作为标记抗原来测定 E_2 、T、Aldo、 E_3 、P、B、 $\text{E}^{[55,56]}$,其缺点是很不稳定,并易引起蛋白变性。碘标有它一定的优点^[57,58],但是我们同意 Abraham 提出用氚标记物的意见^[5],他的理由是:(1) 用氚标记物作放射免疫测定,可以避免 γ -射线对工作人员的侵害。(2) ^3H 半寿期长(12 年)比较稳定,SA 在一定时间内(至少 6 个月)不会有明显改变。而 ^{125}I 标记物则在 2 个月后,SA 就将减低 50%, ^{131}I 时间更短。(3) 氚标记馏体可作内标准回收试验,因为它的化学性质同非标记馏体一样,而碘标记的

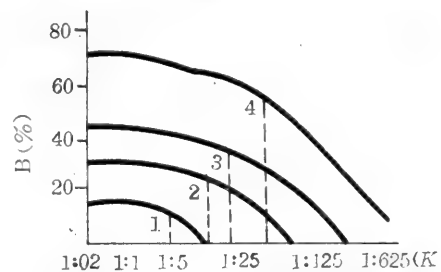


图 5 四种标记物抗血清效价曲线的比较

- 1 $^3\text{H-T}$
- 2 $^3\text{H-T-3 Oxime}$
- 3 $^3\text{H-T-3-Oxime-lysine}$
- 4 T-3-Hist- ^{125}I

甾体衍生物则不同,它的层析图谱也与非标记甾体不同。(4)氚标记甾体的纯化,可用对非标记甾体纯化完全相同的方法和相同的层析系统。此外,我们还认为,用氚标记物作放射免疫测定,方法比较稳定,重复性和精密度都很好,非特异性结合率也较低。并且氚标记系统还能提高抗体的特异性^[6]。

六、实验条件及样品处理

为了使试验在最适条件下进行,除对抗血清和标记抗原有严格要求外,必须对试剂,反应条件和分离方法,有所选择,并对样品进行适当的预处理。

1. 试验的缓冲液

免疫反应一般都在一定 pH 的缓冲液中进行,缓冲液的 pH、离子强度及其化学性质,对抗血清的特性和试验结果都有影响。Hennam 等^[59]比较了磷酸缓冲液 (pK7.2, pH7.0) 及麦黄酮 (Tricine) 缓冲液 (pK8.1, pH8.0) 在测定尿睾酮葡萄糖苷试验中,发现用麦黄酮缓冲液灵敏度较高。其他作者在测定睾酮、雌二醇、孕酮方法中也对 pH 值、离子强度的影响作了研究,认为 0.1M 磷酸钠缓冲液, pH 接近中性,对这些激素的测定是最适宜的^[60]。Hotchkiss 提出^[61],在缓冲液中加入 0.1% 明胶,能提高实验的精密度,减低空白值,因为明胶能增加低极性甾体激素在缓冲液中的溶解度,并且能去除一些干扰物对空白值的影响。我们实验室选用于甾体放射免疫测定的缓冲液是, 0.1M 磷酸钠缓冲液 pH7.0, 含 NaCl 0.9%, 明胶 0.1% (简称 0.1%GPS)。

2. 反应的温度和时间

抗原-抗体反应的速度和完全程度与反应时间和温度有关。为了选择较理想的温度和时间,我们对反应的时间和温度曾作了试验^[30],发现在 4℃, 反应 24 小时较为适宜,同时也表现温度高 (25° 或 37℃), 反应速度快,但是结合物解离速度也较快,因此结合率 (B% 值) 较 4℃ 时低。在 4℃ 反应 2 小时后,反应完全的程度已达 90% 以上 (与 24 小时相比较),因此一般认为,甾体放射免疫测定在 4℃, 反应 4—16 小时即可。并且温度低,能增加试验灵敏度^[36]。

3. B、F 分离方法

免疫反应达到平衡后,须选用适当方法对产生的抗原-抗体结合物 (B) 与游离抗原 (F) 进行分离。方法很多,现将常用的简列如下页表^[6,36]。

以下各种方法各有优缺点。我们采用 DCC 方法来分离 B、F。DCC 方法的特点是 (1) 操作简便,过程简单。(2) 分离效果好 (吸附游离激素在 95% 以上), 分离时间快 (保温 10—15 分钟)。(3) 非特异性干扰小。我们长期使用结果,平均非特异性结合率 (N%) 一般都在 1% 以下。(4) 稳定性和重复性好,使实验结果有较高的精密度,标准曲线的变异系数 (CV) 在 2.4% 左右。有人也比较了几种分离方法^[50] (见表 9), 显示 DCC 方法尚比较理想,结合率 (B₀% 值) 较大,而非特异性结合率 (N%) 低。

类 型	方 法
沉淀游离抗原 (F)	葡聚糖加膜活性炭(简称 DCC) 硅酸镁 漂白土
沉淀抗原-抗体结 合物 (B)	双抗体法 (简称 DA) 硫酸铵法 聚乙二醇 (PEG)
固 相 法	聚丙烯或聚苯乙烯试管内壁上吸附抗体 抗体聚合成固相 将抗体结合到 sephadex 衍生物上 抗体吸附于微玻璃珠上

表 9 几种分离方法的比较

方 法	³ H-睾酮	³ H-雌二醇	¹²⁵ I-睾酮	¹²⁵ I-雌二醇
	N%B ₀ %D (dpm)	N%B ₀ %D (dpm)	N%B ₀ %D(dpm)	N%B ₀ % (dpm)
DCC	2 70 10100	5 66 10600	12 62 12500	1 51 7700
硫酸铵法	12 41 6800	28 63 9600	33 41 9500	30 27 3000
DA	3 33 5200	4 65 9800	6 32 7520	3 48 8500
PEG	8 28 4700	6 43 7000	5 40 15300	— — —

4. 样品预处理

在进行免疫试验前,对被测样品是否需要适当的纯化,取决于(1)所用抗血清的特异性,(2)样品中产生干扰物质的浓度,(3)血浆蛋白和脂肪的非特异性干扰。

如果所用抗血清特异性很强,而被测物质与干扰物质相比在样品中的浓度又很高,则这种样品只要用缓冲液稀释到使蛋白质和脂肪的非特异性干扰在最小范围情况下,就可直接进行免疫测定。相反,如 C-11-P 结合物产生的抗血清特异性很强,与皮质激素的交叉很小,但是这些皮质激素在血浆中的浓度很高,因此还必须进行选择性的溶媒抽提,以除去这些物质的干扰^[40]。低极性分子甾体可选用非极性溶媒抽提。如,石油醚抽提血浆中孕酮,则高极性的皮质激素仍极大部分留在血浆样品中。我们发现用重蒸二氯甲烷抽提甾体激素(除雌三醇外),回收率一般都在 90% 以上。如果抗血清特异性差,或易起交叉干扰物质的浓度又高,则样品必须作进一步纯化。甾体激素的纯化,除溶媒抽提外,一般常采用各种纸层析,硅胶薄板层析或 Sephadex LH₂₀ 进行分离纯化。也有人提出,用免疫纯化法^[62]可提高方法的特异性。

七、方法学鉴定

评价一个放射免疫分析方法的质量和效果,必须对方法学加以鉴定。如何选择一个简便易行,稳定可靠的方法,就需用统计学来处理和分析实验结果,检验方法的准确性、灵敏度、精密度和特异性。

1. 准确性

放射免疫分析法的准确性试验,一般是在去甾体激素或低浓度甾体的血浆样品中添加已知量的标准激素(标记的或未标记的均可),测它的回收率。理论上添加量和回收量的相关系数应该等于 1.0 (即回收率应该是 100%),但是由于受方法灵敏度、特异性和实验误差的影响,实际测得的数值往往低于 100%。回收率越高,方法的准确性越好。我们测定的几种甾体激素的回收率见表 10。

2. 灵敏度

对灵敏度,不同作者有不同的定义。Ekins^[55]把“最小可测量”作为灵敏度的定义,即刚好能与 0 剂量区别开来的最小可测量。这是比较一致同意的看法。Abraham 等^[5,36]认为,估价放射免疫分析的灵敏度有二种类型。(1)标准曲线的灵敏度:即规定标准曲线的最小可测量与 0 剂量相差非常显著(可信限 95%)。计算方法就是

$$C = \overline{(B\%)} - 2SD (n > 4)$$

C 代表标准曲线灵敏度, $\overline{(B\%)}$ = 在 0 剂量的平均结合率, SD 是标准差, n = 测定次数。决定这种灵敏度的因素: (a) 抗血清的亲合力。 (b) 试验系统中标记物和抗体的量。 (c) 反应液体积。 (d) 试验的精密度。因为理论上灵敏度达到的极限是由抗血清的亲合力所决定,但是实际上不能达到这个极限,因为它还受到标记物和抗体用量的影响,亲和常数是用质量同体积的比例来表示,所以灵敏度又和反应液体积有关,同时每个方法都有固定的误差,因此又和精密度有关。(2) 试验方法的灵敏度^[12,63]: 就是整个测定方法,所能测出的未知样品的灵敏度。这种灵敏度同 (a) 标准曲线灵敏度、(b) 空白值、(c) 样品的回收率有关,计算方法:

$$S = \frac{2 \times SD}{R \times F} \times 100,$$

S 代表试验方法灵敏度, SD = 平均空白值的标准差 (n = 4), R = 回收率(%), F = 回收激素用作测定的部分。当空白值小到不能被测出时,则可用标准曲线的灵敏度代替 $2 \times SD$, 即 $S = \frac{C}{R \times F} \times 100$, 从计算公式中可以知道,要使试验方法有最大的灵敏度(即 S 最小)则 $2 \times SD$ 或 C 必须很小,而 R 和 F 必须很大。

3. 精密度或重复性^[8,10,30]

精密度反映了测定方法的重现性,精密度越高,重复性越好。通常用重复测定的标准差和变异系数 CV 来表示 ($CV = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$, \bar{X} = 测定值平均数)。

在免疫分析中常以批内重复试验和批间重复试验的变异系数来表示方法的精密度。精密度受几种因素的影响,其中以剂量-反应曲线的性质最为重要,实践表明,为了得到满意结果,结合率 (B%) 必须下降到原来的一半或更低。其次,测量仪器的稳定性、计数效率、计数时间、反应条件和工作人员的实验误差等因素,都会直接影响试验方法的精密度^[56]。我们测定的几种甾体激素的精密度、灵敏度、准确性见表 10^[8,10,30,64]。

表 10 几种甾体激素测定的灵敏度、精密度和准确性

激素名称	标准曲线 灵敏度 (pg)	试验方法* 灵敏度 (pg)	批内试验 CV(%)	批间试验 CV(%)	方法回收率 (%)
T	5	26	6.9	12.5	97
F	50	266	4.9	12.7	94
Aldo	5	106	5.3	9.2	94
E ₂	5	16	8.4	13.2	94
β	50	266	5.9	12.8	94
E ₀	3	10	4.8	10.7	95

* 样品测定的灵敏度。

4. 特异性

在放射免疫测定中,方法的特异性,大部分是决定于抗体的特异性和亲和力,在实验条件相同情况下,抗血清越特异,干扰交叉就越小,方法越特异。其次是被测样品的纯度,样品处理得越纯,越能提高方法的特异性。

八、结 束 语

甾体激素的放射免疫测定是一项新技术。它的特点是灵敏度高、特异性强、样品取量少、操作简便、便于规格化。目前广泛应用于医学、生物学、生物化学的研究工作中。它对提高临床诊断水平,发现新的病种,促进内分泌学的发展起了积极作用。同时也为进一步研究激素作用机理,某些疾病的发病原因,计划生育、以及分子生物学、免疫学、药学工业等方面,提供了新的方法和途径。随着放射免疫“药箱”的生产和同位素计量仪器的发展,这一技术必须将很快被普及推广,为国家实现四化作出有益贡献。

参 考 文 献

- [1] Erlanger, B. F. et al., *J. Biol. Chem.*, 1957, 228, 713.
- [2] Erlanger, B. F. et al., *J. Biol. Chem.*, 1959, 234, 1090.
- [3] Lieberman, S. et al., *Recent Prog. Horm. Res.*, 1959, 15, 165.
- [4] Beiser, S. M. et al., *Science*, 1959, 129, 564.
- [5] Abraham, G. E., *Acta Endocrinol.*, 1974, 75, Suppl. 183.
- [6] Cameron, E. H. D. et al., *Steroid Immunoassay*, 1975, Alpha Omega Publishing Ltd. Cardiff, Wales, U. K.
- [7] Midgley, A. R. et al., *Acta Endocrinol.*, 1970, 64, Suppl. 147.
- [8] 上海第二医学院内分泌研究室, *中华医学检验杂志*, 1978, 1(1), 25.
- [9] Kaniji Sato et al., *Steroids*, 1977, 29, 295.
- [10] 丁霖等, *上海医学*, 1979, 2(6), 47.
- [11] Ogihara, I. et al., *J. Clin. Endocri. Metab.*, 1977, 45, 726.
- [12] Simpson, T. H. et al., *Steroids*, 1977, 29, 383.
- [13] Forest, M. G., *Horm. Res.*, 1976, 7, 260.
- [14] Cindom, R. et al., *J. Steroid Biochem.*, 1977, 8, 1085.
- [15] Exley, D. et al., *J. Steroid Biochem.*, 1976, 7, 109.
- [16] Den Hollander, F. C. et al., *Steroids*, 1974, 23, 549.
- [17] Condom, R. et al., *J. Steroid Biochem.*, 1977, 8, 1165.
- [18] Baker, T. S. et al., *Steroids*, 1977, 29, 429.

- [19] Rao, P. N. et al., *Steroids*, 1976, **28**, 101.
- [20] Rao, P. N. et al., *J. Steroid Biochem.*, 1978, **9**, 539.
- [21] Lindner, M. et al., *Steroids*, 1977, **29**, 161.
- [22] Khadempour, M. H. et al., *Clin. Chim. Acta*, 1978, **82**, 161.
- [23] Condom, R. et al., *Steroids*, 1974, **23**, 483.
- [24] Vills, G. O. et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1972, **35**, 458.
- [25] Wright, K. et al., *Steroids*, 1973, **21**, 755.
- [26] Nambara, T. et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 1976, **24**, 1510.
- [27] 上海第二医学院附属瑞金医院妇产科等, 上海医学, 1979, **2**(16), 51.
- [28] Kellie, A. E. et al., *J. Steroid Biochem.*, 1972, **3**, 275.
- [29] Jaffe, B. M. et al., *Methods of Hormone Radioimmunoassay*, 1974, 375. Behrman, Academic Press, New York, N. Y.
- [30] 上海第二医学院内分泌研究室, 放射性同位素在基础医学中的应用, 1979, 222, 原子能出版社。
- [31] Axen, U., *Prostaglandins*, 1974, **5**, 45.
- [32] Rodbard, D. et al., *J. Lab. Clin. Metab.*, 1969, **74**, 770.
- [33] Zettner, A., *Clin. Chem.*, 1973, **19**, 699.
- [34] 镇目和夫和熊原雄一, ラジオイムノアッセイ, 1977, 78, 朝仓书店。
- [35] Healy, M. R., *Biochem. J.*, 1972, **130**, 207.
- [36] Abraham, G. E., *Handbook of Radioimmunoassay*, 1977, Marcel Dekker, New York, N. Y.
- [37] Felber, J. P., *Adv. Clin. Chem.*, 1978, **20**, 129.
- [38] Ekins, R. P. et al., *J. Steroid Biochem.*, 1972, **3**, 289.
- [39] Pratt, J. J. et al., *Eur. J. Nucl. Med.*, 1976, **1**, 37.
- [40] Pratt, J. J., *Clin. Chem.*, 1978, **24**, 1869.
- [41] Vaitukaitis, J. et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1971, **33**, 988.
- [42] Gupta, D., *Radioimmunoassay of Steroid Hormones*, 1975, Verlag Chemie Gmb.
- [43] Walker, C. S. et al., *Steroids*, 1973, **21**, 259.
- [44] Niswender, G. D. et al., *Immunologic Methods in Steroids Determination*, 1970, Appleton-Century-Crofts, New York.
- [45] Landsteines, K., *Specificity of Serological Reactions*, 1945. Harvard University Press, Cambridge Mass.
- [46] Bermudez, J. A. et al., *J. Steroid Biochem.*, 1975, **6**, 283.
- [47] Grover, P. K. et al., *J. Steroid Biochem.*, 1977, **8**, 121.
- [48] Bauminger, S. et al., *J. Steroid Biochem.*, 1974, **5**, 739.
- [49] Pasternak, C. A., *Radioimmunoassay in Clinical Biochemistry*, 1975, 141, Heyden & Son Ltd.
- [50] Abraham, G. E. et al., *J. Clin. Endocri. Metab.*, 1971, **32**, 619.
- [51] Exley, D. et al., *Steroids*, 1976, **27**, 813.
- [52] Edward, R. et al., *Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine*, 1974, **11**, 31, International Atomic Energy Agency Vienna.
- [53] Midgley, A. R. et al., *Acta Endocrinol.*, 1970, **64**, Suppl. 147, 321.
- [54] Al-Dujaili, E. A. S. et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1978, **46**, 105.
- [55] Euan, H. D. et al., *J. Steroid Biochem.*, 1974, **5**, 749.
- [56] Jeffcoate, S. L., *Pathologie Biologie*, 1975, **23**, 903.
- [57] Hennam, J. F. et al., *Steroids*, 1973, **21**, 285.
- [58] Tillson, S. A. et al., *Immunologic Methods in Steroid Determination*, 1970, 127. Appleton-Century-Crofts, New York.
- [59] Hotchkiss, J. et al., *Endocrinology*, 1971, **89**, 177.
- [60] Comer, S. C. et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1973, **36**, 795.
- [61] Delassalle, A. et al., *Steroids*, 1977, **29**, 725.
- [62] 丁燧, 中华医学检验杂志, 1981, **4**.
- [63] 丁燧, 中华医学检验杂志, 1981, **4**.
- [64] 丁燧, 中华医学检验杂志, 1981, **4**.

小肽放射免疫分析近况

陆以信 张明芬

(上海市高血压研究所) (上海市内分泌研究所)

潘家秀

(中国科学院生物化学研究所)

- 一、引言
- 二、小肽免疫原的制备
 - 1. 偶联载体的选择
 - 2. 肽-载体免疫原的联结
- 三、抗血清的获得
 - 1. 抗体检测及评价
 - 2. 免疫失败后的考虑
 - 3. 单克隆技术制备抗体
- 四、多肽的同位素标记
 - 1. 标记同位素的选择
 - 2. 放射碘标记
 - 3. 标记肽的纯化及贮存
 - 4. P^* 的比放射度及其测定
 - 5. 无可标记氨基酸的肽的标记
- 五、 P, P^* 对抗体的竞争结合反应——培育条件
 - 1. 理论方面的考虑
 - 2. 实验探求最佳条件
 - 3. 非特异性干扰
- 六、BF 分离系统的选择
- 七、其他有关问题
 - 1. 标准品
 - 2. 待测样品的处理
 - 3. 肽 RIA 及与生物测定法对照问题
 - 4. 肽 RIA 的方法学评价
 - 5. RIA 的自动化
 - 6. 肽 RIA 的前景

一、引言

放射免疫分析法 (RIA) 由 Yalow 和 Berson 所创始, 于 1959 年首次实现了人血浆中胰岛素的直接测定。此后, 得到迅速发展。从原理上说, 凡具有生物活性的物质, 不论是多肽、类固醇、药物、微生物或病毒抗原, 肿瘤抗原及酶等都能用该法测定。涉及肽 RIA 的专著^[1-11]、综述^[12-24]及文献很多, 大多数肽类激素已建立 RIA 测定 (参见表 1)。在血浆中, 当蛋白浓度比被测激素浓度高十亿倍时, 仍可实现激素的准确度量。如可测出 0.05 pM 浓度的胃泌素^[1]。

小肽 RIA 的困难在于其分子量小 (< 5000 道尔顿), 含量低 ($10^{-10} \sim 10^{-12} M$), 代谢快, 干扰因素多等等。

本文结合我们工作中的一些体会, 对小肽 RIA 的技术及近况, 尤其对抗血清的制备作一些介绍, 以供参考。

二、小肽免疫原的制备

小肽抗原性决定簇, 相当于 3~5^[2] 或 4~8 个氨基酸大小, 并要求一定的复杂性及空间构型。抗利尿激素 (M.W. ~ 1000), 甚至 ACTH (M.W. ~ 4500) 都不是好的免疫原。也有少数小肽如 Secretin、CCK、Oxy. 及 Ang.。自身免疫后也可能引起抗体。有人认为, Oxy. 含有一个酰氨基, 在体内可能与蛋白联结成为免疫原^[7]。通过小肽分子

表 1 部分可用 RIA 测定的肽类激素^[1,19,18]

激素名称	氨基酸数	激素名称	氨基酸数
垂体激素		血管活性组织激素	
促肾上腺皮质激素 (ACTH)	39	血管紧张素 (Ang., Angiotensins) I	8
促黑色素细胞激素 (MSH)	13(α)	II	10
	22(β)	舒缓激肽 (Bra., Bradykinin)	9
抗利尿激素 (Vas., Vasopressin)	9	下丘脑激素	
催产素 (Oxy., Oxytocin)	9	促甲状腺激素释放激素 (TRH)	3
耻骨松弛激素 (Relaxin)	48	促性腺激素释放激素 (GnRH)	10
胰腺激素		生长激素释放抑制激素 (Somatostatin, SRIH)	14
胰岛素 A 链	21	神经降压素 (Neurotensin)	13
B 链	30	其他多肽	
胰升血糖素 (Glucagon)	29	P 物质 (Substance P)	11
胃肠道激素		内啡肽 (Endorphin) α	16
胃泌素 (Gas., Gastrin)	17	β	31
蠕动素 (Motilin)	22	γ	17
肠促胰液肽 (Secretin)	27	脑啡肽 (Enk., Enkephalin)	5
肠促胰酶肽 (CCK, Cholecystokinin)	33	C 肽 (C-peptide)	33
小肠血管活性肽 (VIP)	28	降钙素 (Calcitonin)	32
胃抑制肽 (GIP)	43		

(如 ACTH, Glucagon) 的聚合可增加免疫原性,但由于可能遮盖其抗原性决定簇,不常采用。不少研究者,即使在初期使用未偶联的多肽免疫动物,后来也都选用肽与大分子偶联的免疫原^[3,7,20,25,26]。例如 Buchanan 先以 Gastrin 免疫,得抗血清的效价为 1:10,后改用 Gastrin-BSA 免疫,得抗血清效价为 1:600~1:1800^[11]。有人用 ACTH 免疫 200 个以上的豚鼠,仅得到一只有用的抗血清,而 Kao 等^[27]用 α '-24ACTH-BSA 免疫,在 6 只兔子中就有一只产生了效价达到 100,000 的特异的抗血清。看来,小肽偶联大分子载体后,分子量提高,在组成及构型方面也增加复杂性,成为较好的免疫原。此事实已被公认,并得到广泛应用。

虽然,往往说免疫用的半抗原不必很纯,或许这样有更高的免疫原性^[6,24]。但是,最好还是采用经过纯化的小肽所制成的免疫原,以制备相对较“纯”的抗血清^[2,12]。

1. 偶联载体的选择

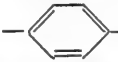
小肽被吸附剂聚乙烯吡咯酮、炭粉、三氧化二铝、乳胶、聚甲基丙烯酸甲酯微粒、羧甲基纤维素等吸附后可能成为有效的免疫原,曾用于 LHRH, Bra., Glucagon, Ang., Gastrin 等,但其效果常存在疑问。然而,使用带强负电荷的葡聚糖硫酸钠吸附带正电荷的 LHRH 免疫兔,得到高质量的抗血清^[28]。在以聚乙烯吡咯酮制备 Ang. II^[26] 及 LHRH 抗体^[28]时,曾发现所产生的抗血清,血凝效价高而 RIA 效价低。可能是由于缺乏载体效应, T 细胞的协同作用不足,延迟了免疫动物从产生 IgM 到产生 IgG 的转换过程。

载体分子对抗体的效价及特异性的影响应予以重视。Talamo 等曾试用舒缓激肽八种免疫原,比较结合方法和载体对它引起的抗体的特异性和亲和力的影响^[29]。Ang. II 的五种免疫原,也表现出统计学上不同的效果^[26]。大多数研究者认为应选用本身有较强免疫性的异源蛋白为载体。载体所产生的抗体,通常在 RIA 中并不引起明显的干扰。然

而,也有人赞成用与免疫动物同源的蛋白作载体,认为,虽然由它们诱发的抗体产生较迟,但复杂性(diversity)较低,具有更多的特异性针对半抗原的抗体^[3]。

最常用的载体多为各种大分子蛋白,如牛血清白蛋白(BSA),兔血清白蛋白(RSA),人、牛、鸡 γ 球蛋白,血蓝蛋白,卵清蛋白,甲状腺球蛋白,血纤蛋白原等等。其选择受到来源,免疫原性,分子大小,溶解度,所需功能团以及各工作者的习惯等影响。BSA具有59个 ϵ -氨基(Lys),17个咪唑基(His),21个酚基(Tyr)以及羧基(Asp、Glu),巯基(Cys)等可连接基团^[30],在不同的pH、离子强度和有机溶剂存在时,甚至在广泛地交联后,仍具有易溶性^[7],因而得到最广泛的使用。甲状腺球蛋白也是一种特别有效的载体蛋白,可能得到广泛的应用。

简单的多聚氨基酸(如多聚赖氨酸,多聚谷氨酸)或多聚混谷氨基酸(如多聚谷、丙、酪氨酸),也被成功地用作载体^[18,31]。但也有人报道,用多聚赖氨酸并不能使四肽胃泌素片段、Bra.和Vas.等成为有效的免疫原。

根据Haber等^[31]的经验,用多聚赖氨酸半琥珀酸作为载体,可取得较好的效果。作者也乐于使用该法^[32-34]。用合成多肽(含有一种或几种氨基酸)时,可控制其结构及分子量,并有数量多的,符合设想的一 NH_2 ,一 COOH 及等供连接基团,达到较蛋白载体高得多的半抗原连接比率。如用多聚赖氨酸半琥珀酸时约每2.8个Lys连上一个Ang. II,半抗原约占总重的45%;当多聚赖氨酸与Ang. II用戊二醛法直接连接后,Ang. II约占总重的65%^[26]。此外,还可得到组成较一致的反应产物,减少可能的竞争抗原,消除由于抗蛋白抗体所带来的干扰^[7,31]。最重要的是可以达到定向地使小肽的一 NH_2 端或一 COOH 端与多肽载体相连接,这为人们试图影响所产生抗体的特异性提供了一种可能性。

用免疫电泳的抗原-抗体特异沉淀带免疫动物,或用抗血清与抗原体外孵育后的复合物免疫,有时有较好的效果。当使用的抗原制剂不太纯时,具有优点。

有些大分子蛋白,可取其具有活性的肽段,如胰升血糖素-羧基端酶解碎片,ACTH的 α 链1~24肽^[27]与载体相联后免疫,以产生特异性更强的抗血清。用肌球蛋白的片段肽及促性腺激素(LH、FSH)和MSH的 β 亚基等免疫后,得到专一性很强的抗体。

2. 肽-载体免疫原的联结

为了得到肽和蛋白间的稳定的连接键,必须使用活性连接剂,可参见表2及有关综述^[2,5,7,8,13]。

三类试剂最常使用。(1)活化羧基(通常在半抗原上)与氨基反应(通常在蛋白上)形成肽键的试剂如:碳二亚胺类,烷基氯甲酸酯,异噁唑基盐;(2)在氨基间形成桥的试剂如:二异脒盐、二亚氨酯、二卤硝基苯、戊二醛;(3)在酪氨酰、组氨酰或赖氨酰间形成桥的试剂如:双功能叠氮盐。其中碳二亚胺类应用最多,但反应较复杂^[26,30,35]。经典法^[35]中使用量过大(较反应当量大数百倍),有使免疫原显著变性的可能,导致产生特异性差的抗体。甚至发生“抗体迷路”现象,不再和原先状态的抗原反应,宜改用更温和条件^[7,26,30]。在合成Gastrin免疫原时,有人以肽:BSA:ECDI = 1:0.067:42(克分子比)为最佳。

当某些肽不易溶于水时,可适当调节pH或加入5~25%的惰性有机溶剂。要注意

表 2 半抗原和蛋白的偶联剂^[7]

偶联剂	反应步骤	水溶性	最适 pH	溶 剂	结 合 形 式
1. 碳二亚胺类					
a. ECDI	1 或 2	高	5.5	H ₂ O	—CO—NH—
b. MCDI	1 或 2	高	5.5	H ₂ O	—CO—NH—
c. DCC	1 或 2	低	—	非水	—CO—NH—
2. 异噁唑盐类					
试剂 K	1 或 2	高	5.5	H ₂ O	—CO—NH—
3. 烷基氯甲酸类			(1)—	二氧杂环己烷	
ECF, IBCF	2	低	(2)9.0	二氧杂环己烷-H ₂ O	—CO—NH—
4. 二异氰酸化合物	2	低	(1)7.5	H ₂ O	
TDI, XDI			(2)9.5	H ₂ O	—NH—R—NH—
5. 二卤代硝基苯类					
a. DNDFB	1 或 2	低	8.5	丙酮-H ₂ O	—NH—R—NH—
b. FNPS	1	低	10.5		
6. 亚胺酯类					
DEM	1	高	9.0	H ₂ O	$\begin{array}{c} +\text{NH}_2 \quad +\text{NH}_2 \\ \quad \\ -\text{NH}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{NH}- \end{array}$
7. 戊二醛 ^[50]	1 或 2	高	4.5—7.5	H ₂ O	—N=CH—R—CH=N—
8. 重氮化盐类	1	高	7.5	H ₂ O	—X—R—X—
BDB					(X=His, Tyr, Lys)

联结过程中可能发生肽的变性,应选择适当的连接剂及反应条件。对少数无适当联结功能基的肽,可以通过有机合成引进,如使用 D-Lys⁶-LHRH、Tyr⁸-Br 等。

看来,免疫原的效应,取决于整个半抗原-载体分子的稳定性,而不在于连接键的化学性质^[7]。

半抗原对载体的结合部位是一种决定抗血清特异性的因素。近连接点的分子部分,由于受“位阻”,常和免疫原性无关;相反,离该点较远的被暴露的远端往往是产生特异性抗体的决定簇^[42,19,23]。如果想得到最佳特异性的抗血清,选择分子中对于免疫识别较为不重要的部位连接是可取的。

在测定连接比(每分子载体接上半抗原的分子数)的方法中,最直接的是测定 (¹²⁵I 或 ³H) 标记的半抗原在合成反应中的参入率,再予计算^[26]。有人提出,半抗原与载体的连接比不同,免疫诱发的抗血清也不同:低比者诱发抗载体及抗半抗原的抗血清,而高比者倾向于诱发抗半抗原的抗血清;低比者诱发的抗体可能具有较高的亲和力,因为它较少触发产生低亲和性抗体的 B 淋巴细胞^[3,7]。然而,一般认为它并不是影响抗体的决定性因素。连接比的范围,大致在每分子蛋白如 BSA 结 5—25 个半抗原分子。或许较可取的是继续用连接比相对较高的免疫原进行免疫。

在整个免疫过程中,一般都使用同一种(半抗原-载体)免疫原,有利于产生好的反应。

三、抗血清的获得

在 RIA 中,抗体是抗原(P)和标记抗原(P*)的特异性竞争结合的中心。RIA 的灵敏度和特异性,在很大程度上取决于所用抗体的亲和力和特异性。

在小肽 RIA 技术中,最不能肯定及最感困难的问题常在于如何得到具有高亲和力和特异性的抗血清。这不仅由于小肽分子小,抗原性弱或缺乏,不易诱发抗体;也因为它的待测含量很低,又混杂着多种可能发生交叉反应的物质;还有免疫动物的个体差异。至今还不能对免疫载体、结合方式、免疫动物种属、品系、佐剂、免疫设计等重要因素同时进行可靠的考察。各个实验室使用的方案,往往是经验性的“艺术”,并不具有统计学上肯定的可靠性。

制备肽抗血清,均需使用佐剂。虽然有一些新的佐剂如 PolyA:U,佐剂 65(抗原水溶液乳化于花生油中,以单硬脂酸作为稳定剂),基本上仍使用“福氏”佐剂,羊毛脂与石蜡油的比例为 1:2~9(V/V)。首次免疫时用全佐剂,即加卡介苗 1~20 毫克/毫升。

动物常用家兔(尤其多用新西兰白兔)和豚鼠,偶用羊、大鼠、小鼠、鸡、鸭等。

小肽的免疫原的剂量范围很大,每次每头动物可用几十至几百微克。免疫途径也各不相同,有皮内、皮下、肌肉、静脉、脚垫、腹股沟淋巴结等。Vaitukaitis 采用数十点皮内低剂量(20~200 微克免疫原)免疫法,并加注百日咳疫苗(0.5 毫升)^[36]效果良好。Lader 等曾用四种不同免疫原比较多点皮内注射和肌肉注射,所得抗血清亲和力几乎相同,前组中滴度稍高,Ang. II 抗体仅在前组中产生。多点皮内免疫法具有免疫剂量小,注射次数少(多为一次注射),抗体产生快(3~6 个月),血清效价达到高峰,持续时间长(一个月),亲和力高等优点,因此近年来应用越来越广^[2,7,22,26]。

强化注射应待抗体效价下降后进行,强化的免疫原剂量要小,注射后约 2 周采血。若采用皮内多点免疫法,一般不进行强化注射。一次免疫效果不好,即另选动物重新免疫。强化注射常不能明显提高效价。

抗血清经超过滤除菌,或加入叠氮钠,硫柳汞等防腐剂,小量分装,置-25℃保存。加入甘油(1:1V/V)可防止冻融,同时也可达到防菌的目的。以上措施可以长期保存抗体效价,若保存得当,至少可以保存 3—5 年以上。冰冻干燥制剂便于运输,但在冻干过程中常可能有 10~30% 效价损失。对正在使用的抗血清,以含 1~2% 正常血清,0.05% 硫柳汞的缓冲液稀释 1:50~1:2000 分装保存,也是可行的。

1. 抗体检测及评价

在免疫期间,不仅各个不同的动物,而且同一动物在不同的时间都可能发生抗血清效价、特异性、亲和力等的变化,因而必须经常地采血测试。只有在对抗血清的效价、特异性、亲和力等方面作彻底的评价后,才可用于 RIA。

(1) 效价 血清中抗体效价的检测有多种方法,值得提出的是,首先要肯定试验方法的可靠性,以免发生抗体的漏检或误检。其中必须包括有一种“一级”免疫反应检测法,以直接度量抗原-抗体间的初级反应,如用硫酸铵沉淀 p^* 与抗体复合物法。用 RIA 测定 p^* 结合率,建立抗血清稀释曲线是必须的步骤。“二级”、“三级”免疫反应检测法仅供参考。各种方法测得的结果有各种表达方式,意义上也有差别,往往难于互相比,甚至有矛盾。实际上,它们是抗体功能的度量,不仅依赖于抗体的“量”,而且还取决于其“质”(类别、价数、亲和力等)以及其他条件。

(2) 特异性 从常规免疫获得的抗血清,虽然其中有占主导的抗体,却总是复杂的性质不尽相同的各抗体群的混合物。各个抗血清可能结合同一肽激素分子中的不同结合

部位。以抗 ACTH 血清为例,见图 1。

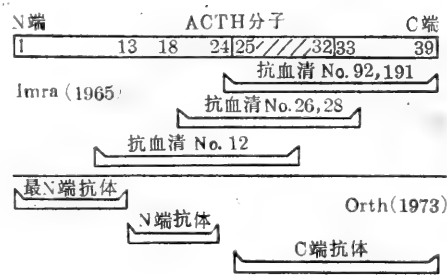


图 1 与 ACTH 分子的不同部位结合的各个抗 ACTH 血清(模拟图)^[5]

在 RIA 测定中,测得的是样本中抗原的免疫活性,并不是生物活性。由于肽类激素的不均一性,存在着前体、不同活性组分、代谢产物等,在各个不同的激素间也可能具有相似的肽段、产生免疫学上的交叉反应。因而抗血清特异性的检查极为重要,它对放射免疫测得数据的可靠性有关键的作用。同一个抗血清,在不同的稀释度工作时,由于发挥主导作用的抗体群可能有变化,也可能导致其特异性的表现有所差异。

抗体的特异性常以交叉反应率表示,其计算有几种方法^[37],如 Lanzon 法、10% 误差法及最常用的 Abraham 法。后者以产生同等的 50% 的抑制效应时,交叉反应物与要求测定抗原的质量比表示。

(3) 亲和力 抗体亲和力是决定 RIA 灵敏度的关键因素,是评价抗血清的主要指标,还可用于计算最适的 RIA 条件。它以亲和常数 K 表示,单位为升/克分子。实际上测得的 K 值是抗血清中各抗体群的平均亲和常数,也可称为有效亲和常数 (K_{eff})。在 RIA 中,所能达到的最低检出量(灵敏度)是 K_{eff} 的函数,

$$\text{或} \quad \frac{db}{d[\text{Ag}]} = \frac{4 \sqrt{2}}{\sqrt{KSUT}} \quad [5]$$

$$\frac{db}{d[\text{H}]} = -\frac{4}{27} K^{[6]}$$

(式中 K ——亲和常数, S ——标记抗原的比放射性, U ——RIA 时的孵育体积, T ——放射计数时间, b —— p^* 结合率, $[\text{Ag}]$ 或 $[\text{H}]$ 为被测抗原的浓度)。 K 值越高的抗血清,所得 RIA 标准曲线的灵敏度越好,见图 2。一般 RIA 中适用的抗血清要有

$$K \geq \frac{1}{[\text{H}]},$$

通常 K 范围在 $10^8 \sim 10^{12}$ 之间,也可能高至 10^{14} ^[1,26]。

测定 K 的方法约有 20 多种^[38]。在 RIA 中,可使用 Sips^[39] 方程,可同时测出抗血清的均一性常数 α 。但更多的是使用 Scatchard 图解法,此法还可求出溶液中抗体结合部位的克分子浓度 (q),计算程序并不复杂,可参见文献^[4]。由于该方程式的局限性,抗血清中抗体的不均一性及多个结合部位,以及抗血清对标记的和未标记的配基具有不同亲和力等原因,常得到非线性图,影响结果的正确性。文献并列出了图形出现非直线现象(如上凸、下凹、垂直或末端向左方弯曲等)的可能原因^[4,5]。使用电子计算机测定 K 的模型也已提出,简化了测定。

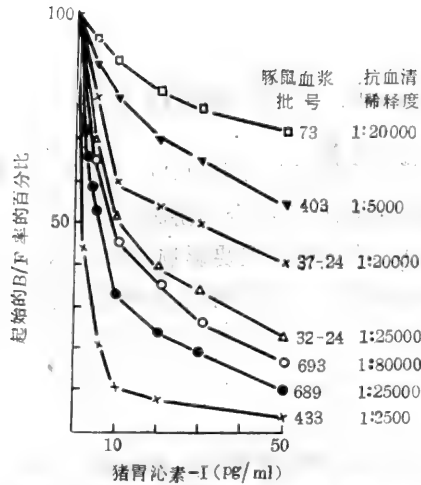


图2 在胃泌素测定中,不同抗血清灵敏度的比较^[6]。在所有例子中,起始 B/F 率在 0.5~1.0 之间。

2. 免疫失败后的考虑

在 RIA 领域中,如果未能获得满意的抗血清,可以试行^[11]: (1) 改变免疫动物的种属及品系; (2) 改变半抗原(如肽)的批号或考虑改变其部分化学结构; (3) 改变免疫原的性质(如连接的载体、连接方式、连接比等); (4) 改用其它佐剂系统; (5) 改变免疫进程(如免疫剂量、免疫途径、免疫次数等)和扩大动物数目。此外,还可以从其他方面考虑: 动物饲养有否不当,营养是否失调等。如果系免疫耐受,可在休整 3—6 个月后再试行一次小剂量注射。

一般认为采用低剂量免疫,延长免疫时间,可获得高亲和力抗血清^[39]。从理论上说,还可以通过纯化抗体的方法提高亲和力和特异性,但往往导致抗血清部分变性,效果有限,因此目前绝大多数仍用不经纯化的抗血清工作。有的作者发现,高亲和力的抗体群有优先与内源抗原激素结合的现象^[2],降低抗血清的平均亲和力和 RIA 的灵敏度。可以试用酶或阻断剂(碘化钠、尿素、硫氰酸钠等)打破这种结合。例如抗 Ang. II 及抗 Vas. 的血清,经上述处理后,曾使剂量反应曲线的灵敏度提高 10 倍以上。

内源性激素免疫后,有可能发生强烈的生理效应。如 Vas. 免疫后偶尔产生尿崩症;也可能引起动物内源性激素与抗体结合,再通过反馈机制,使循环中的该激素水平大大升高(如血管紧张素)。此时应减少免疫剂量,增加佐剂量,并对症治疗。

在首次免疫前几天至两周,先用在免疫原中可能存在的杂抗原静脉注射,可能实现对杂抗原的免疫耐受,减少杂抗体的生成;利用被动抗体抑制法,也可能抑制低亲和力抗体的产生。

3. 单克隆技术制备抗体

用单克隆技术 (Monoclonal technique) 制备单特异性无性纯系抗体是免疫学的新发展。排除了动物的个体差异及多种影响因素,为大量制备优质抗体及鉴别和纯化稀有的生物学组分开辟了新的前景^[40]。今后,它的主要商业用途将是替代动物来制备目前所用的

动物抗血清。

四、多肽的同位素标记

在 RIA 中,标记肽 (P^*) 不仅参与多肽 (P) 对抗体结合部位 “q” 的竞争抑制,而且是整个检定中供作度量放射性、计算结合与游离比 (B/F) 的因子。它是最基本的和最易变的成分,对检定的灵敏度、特异性有重要影响。我们不仅希望 P^* 的比放射性及免疫活性好,还要求检测容易,制备稳定,贮存期长。供标记的肽应尽量采用纯度和活度最好的制剂。

1. 标记同位素的选择

在竞争放射分析中,可作标记用的放射性元素很多。至今,几乎所有实用的肽 RIA 中,都使用 ^{125}I 标记肽。 ^{125}I 标记的最大优点是能获得高的比放射度,检测方便和基本保持原有的免疫活性。

2. 放射碘标记

放射性碘标记的原理是使某种氧化形式的碘,或许是 I_2 或 I^+ 离子,取代肽链中 Tyr 中酚羟基邻位上的氢或在较少情况下取代 His 中咪唑基上的氢。其方法已有不少报道,如氯胺 T 氧化法、乳过氧化酶法、电解法、碘标活性试剂法、 ICl 法、元素 I_2 法、氯气/次氯酸盐法等。在实用上主要是前二法。

(1) 氯胺 T (Ch-T) 法 至今应用最广,Greenwood 和 Hunter 的经典法产生的 p^* 能用于 RIA,但常常反应条件过于剧烈,以至改变了 P 的物理化学性质和生物活性、免疫活性。已提出不少改进方法,都采用减少试剂浓度、扩大反应体积、降低温度等更为温和的反应条件,或仅标记很少比例的肽分子、再通过高分辨力的分离技术,来获得所要求的高质量的单碘标记肽。

Nielsen 法^[41] 已为不少工作者所采用,效果很好。通常约 10 微克肽与 200 微居里 Na^{125}I ,以 10~30 微克 Ch-T 反应, ^{125}I 的利用率约达 60%,经 DEAE-Sephadex A25 离子交换柱层析法分离未标的、双碘的及损伤的肽,可制得高比放射度的单碘标记肽。仍保留良好的免疫活性。图 3 示 Ang.II^* 的分离。

在标记反应时,添加 5~10 微升二甲亚砜能有效地降低胰高血糖素等分子中色氨酸及甲硫氨酸的氧化损伤^[42]。选择偏碱 ($\text{pH}8 \sim 9$) 条件,有利于产生单碘标记肽。

使用得当时, Ch-T 法具有操作快速简便,产率高、适用性强等优点。不少工作者仍认为本法制品并不劣于他法产物。

(2) 乳过氧化酶 (LPO) 法 LPO 制备及贮存并不困难^[43]。标记反应条件温和,所需 H_2O_2 浓度极低 (1~2 微克分子),甚至可能省去 H_2O_2 ,或代以添加葡萄糖氧化酶^[7]。碘化的最适 pH 为 4.5~5.0,而在 $\text{pH}3.0 \sim 10.0$ 都可发生有效的碘标反应。它通常不招致氧化损伤,也可标碘于组氨酸残基(如标 CCK),产物较均一,免疫活性好,比度高,保存性好。对肽链上不同位置的酪氨酸有选择性的标记作用,增加了获得单碘标记物的机率。LPO 的自身标记率并不高。其应用正在扩大。

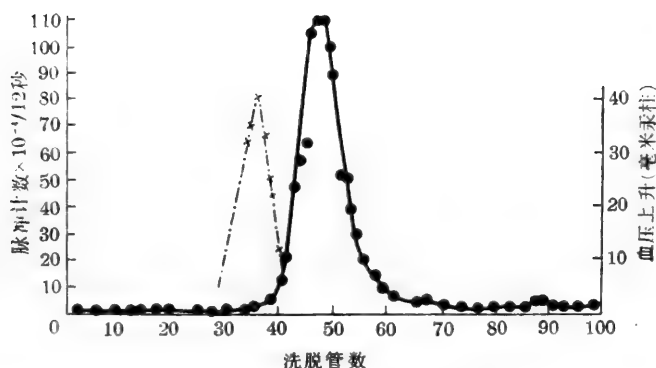


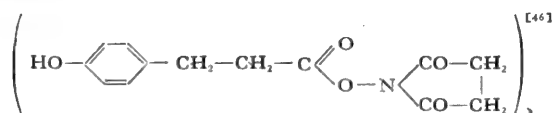
图3 ^{125}I 标 AngII_a 柱层析分离图^[45]
 DEAE-Sephadex A-25 (1×85厘米) 0.1M, pH7.6
 磷酸盐缓冲液洗脱, 流速 1.3 毫升/管·5'。
 生物鉴定(x), 为每 0.05 毫升洗脱液静脉注射引起大白鼠血压升高值。
 ●——●, 为标记 AngII_a 洗脱峰;
 ×-----×, 为未标记 AngII_a 洗脱峰。

LPO 可偶联至固相载体, 如纤维素、葡聚糖、聚丙烯酰胺、Sepharese-4B, 顺丁烯二酸酐、丁二醛、丁二烯-醚共聚物等, 经固相化后再行标记, 减少了干扰杂质, 便于酶和 P^* 的分离。当用 LPO 并不能得到满意的标记时, 也可尝试用其他过氧化物酶, 如辣根过氧化物酶, 甲状腺过氧化物酶, 氯过氧化物酶 (Chloroperoxidase) 和髓过氧化物酶 (Myeloperoxidase)^[7]。

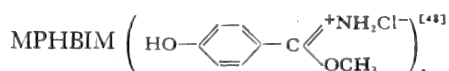
使用过高浓度的 H_2O_2 或部分失活了 LPO, 将影响标记反应和 P^* 的质量, 它们以新配为宜。当酶制剂混有蛋白酶, 或试剂中含有还原剂时, 将干扰标记过程。各批商品 LPO 活性可能有差别, 最好直接测定其活性。由于尚不清楚的原因, 随放射碘源的批号不同, 也可能造成碘标反应的困难^[41]。看来, 对于易损伤的蛋白或肽, 酶碘化法肯定是有优越性的。然而, 对于比较稳定的小肽的常规碘标, 其优越性尚待肯定。

(3) 电解法 电解法可在中性 pH 进行, 通过调节电解池的电流及时间, 可以控制标记的程度。经改进后, 也可用于小体积微量激素的标记^[45], 但比较费时。

(4) 碘标活性试剂法 通过标记活性试剂, 如 Bolton-Hunter 试剂即 N-琥珀酰亚胺 3-(4-羟基苯)丙酸酯



苯胺^[47]及



然后共价键偶联到肽或蛋白上。这种方法的反应条件温和, 降低了放射、氧化、降解等损伤的可能性。对于个别的没有合适的可标氨基酸的肽 (如 CCK), 或含有巯基等特别易损伤的肽有应用意义。但反应较复杂, 难以掌握, 操作较烦而费时, 同时在分离纯化时常存在一定困难。由于引进了带有 I^* 的较大的活性基团, 也有可能改变小肽标记物的免疫活性。

(5) 标记损伤 碘标过程中,抗原免疫活性受到损伤的原因尚不完全清楚。

(A) 碘源——它往往是引起标记物制备不稳定的重要原因。用不好的 ^{125}I 源标记,可导致 P^* 丧失其生物与免疫活性,其原因或所谓“有害因子”尚不清楚^[4]。试用不同来源及批号的 ^{125}I 源及不同的标记方法,有助于发现并克服这个问题。

(B) 其他因素——标记过程中肽的氧化、聚合、降解、电荷的改变等都是可能引起损伤的因素。此外,由于半径较大的碘原子的引入,可能导致立体构型的变化。又由于酪氨酸常是抗原决定簇的组成成分,所以某批标记物的免疫活性的变化,也常随所使用的抗体的特异性而有差异。对于每种待标的物,值得选择几种标记法进行预试,然后再通过实验决定最适的碘标操作。

3. 标记肽的纯化及贮存

标记反应液是个混合物,不仅含有参加反应的 P 、 NaI^* 和试剂,还产生标记程度不同的 P^* 及损伤物等成分。如胰高血糖素经 I^* 标记后就可能产生 8 种碘标产物。所以标记后必须经过纯化。采用离子交换层析,梯度洗脱,凝胶电泳,聚丙烯酰胺电泳,等电聚焦电泳等分辨力强的方法,常能更为清晰地分离未标记肽、损伤肽、双碘标记肽等。不仅提高 P^* 的纯度及比放射性,而且可以从复杂的组分中分离到所要求的单碘标记物。这样也使得 P^* 的制备变得更有重现性、更为稳定。特别当要求高比度 P^* 时,这种方法明显优于一般的分子筛过滤及物理吸附(滑石粉、漂白土、石英粉、纤维素、葡聚糖包裹活性炭等法)。这些方法在此不予赘述。但是,值得指出决不应忽视“纯化”技术,它有时能收到意外的比改变标记反应条件更佳的良好。

P^* 必须经过可靠的检定,并进行合格的质量控制,可参阅有关专著及综述。好的能重复的标准曲线的获得是一个简单而又基本的 P^* 质量指标。

多数 ^{125}I 标记小肽,用含有如蛋白、酶抑制剂、抗氧化剂、抗聚合剂等缓冲液适度稀释后,分装成小份,冻存于 -20°C ,常可使用 1~2 个月以上。应避免反复的冻融。酸性乙醇或丙酮也是良好的贮存介质。加入人或牛血清白蛋白、抑肽酶或二巯基丙醇等可延长贮存时间。经验表明,不同的 P^* 具有不同的贮存性。如果 P^* 能经受冰冻干燥,则贮存及运输都很方便。

4. P^* 的比放射度及其测定

根据 RIA 原理,在测定管中加入的 P^* 量最好与待测物的最低浓度相近。比度高有助于达到较高的 RIA 灵敏度。但盲目地追求高比度,往往导致免疫活性的改变,降低检定的特异性和灵敏度,其有效使用期也大为缩短。Berson 和 Yalow 提出放射“衰退灾难”(Decay catastrophe)现象^[6]。就是说,如果 P^* 分子标上多个放射性原子,当第一个放射性原子衰变时,除可能产生游离的放射性元素或标记碎片外,还可能产生虽仍留有标记同位素,但结构上已有某种“损伤”的 P^* 。通常最适的标记水平是每分子抗原标记上一个放射性碘原子。理论上,每个分子标上一个放射性原子时所达到的比放射度(微居里/微克)为 $130 \times 10^6 \times \frac{1}{\text{激素的分子量}} \times \frac{1}{\text{半衰期(天)}}$ 。即对 ^3H 标记物为 2.92×10^4 居里/克分子, ^{14}C 是 6.24×10 居里/克分子, ^{125}I 是 2.17×10^6 居里/克分子。可见 ^{125}I 标

记物的比放射度较高。无载体 Na^{125}I 源本身的比放射度,从文献中看约在 17~22 毫居里/微克间。对于每个 RIA 测定,可以从待测激素浓度,检测条件与仪器效率等估计出每种 P^* 所要求达到的比放射度。

标记后存在于示踪物 P^* 中的抗原量,通常仅是几个微克级,因而用传统的物理化学方法很难定量。 P^* 比放射度的测量大致有二类方法:第一类,通过反应混合物的分析,测出碘化反应中碘的利用率,再从加入的待标抗原量及其回收率进行粗略估计^[2]。第二类采用放射免疫法,通过 $\text{B/B}' \sim [\text{P}]$ 图解法^[49],等价点法^[50]或自身取代法^[51],测出加入 P^* 的相应的质量,再进行计算。作者曾实验比较四种测定方法,证实自身取代法较为准确可靠。

5. 无可标氨基酸的肽的标记

有些小肽的结构中没有可供碘标记的基团,除使用碘化活性试剂偶联法外,也可改用经取代或添加酪氨酸的该肽的类似物进行碘标记,如曾使用 $\text{N-Tyr-Somatostatin}$ 、 $\text{Tyr}^2\text{-Bra}$ 、 $\text{Tyr}^8\text{-Bra}$ 或 $\text{Tyr}^1\text{-Kallidin}$ 、 N-Tyr-P 物质等;或连接该类肽至含有酪氨酸的合成肽或蛋白上,如四肽胃泌素连至多聚 Glu-Ala-Tyr (70:25:5) 上,然后再标记。

五、 P 、 P^* 对抗体的竞争结合反应——培育条件

P 、 P^* 对抗体上特异结合部位的免疫反应及其竞争抑制现象是 RIA 的定量基础。根据所研究的免疫反应系统的特性及对灵敏度的要求,有必要去辨明最适当的免疫反应的培育条件。

1. 理论方面的考虑

关于 RIA 中抗原抗体竞争抑制反应,至今已提出了许多动力学及数学模型。它们虽都基于质量作用定律,但对反应实质的假设(如抗原、抗体的价数,反应历程等)互有差别,表达方式及作图方法不同^[5]。Yalow 及 Ekins 二组的模型,通常认为可供指导^[6,9]。

Schöneshöfer^[52] 以多肽及类固醇 RIA,比较四种曲线配置模型,提出评价竞争蛋白结合的物理化学特征及最优化的计算机程序。认为在多肽 RIA 中,logit-log 回归模型等于或好于半对数内插模型。

当我们测定了抗血清的亲合常数 K ,结合部位浓度 q 以及标记物的比放射度(从而知道加入各测定管中 P^* 的质量)后,就可能利用 RIA 的理论模型,经数学推导,得出该 RIA 的最适条件,选得适当的抗体、 P^* 浓度比,达到较佳的灵敏度和精密度。 K 、 q 与 P^* 浓度变化对理论曲线的影响可参见文献^[5,7,10]及图 4。

在竞争结合检定中,当采用平衡技术时,由于在孵育混合液中所用标记物 P^* 及结合试剂浓度 q 方面的差别,可分成在理论上有所差异的三种类型^[21]。第一种是 $\text{P}^* \rightarrow 0$,

$$q = \frac{0.5}{K},$$

此时,当标准物 P 为零时,结合率 $\text{B}_0/\text{F}_0 = 0.5$ 。这实际上是 Berson 和 Yalow 所确定的条件,可得到最陡的剂量反应曲线,但精密度较差,导致理论上所预期的灵敏度的降低。第

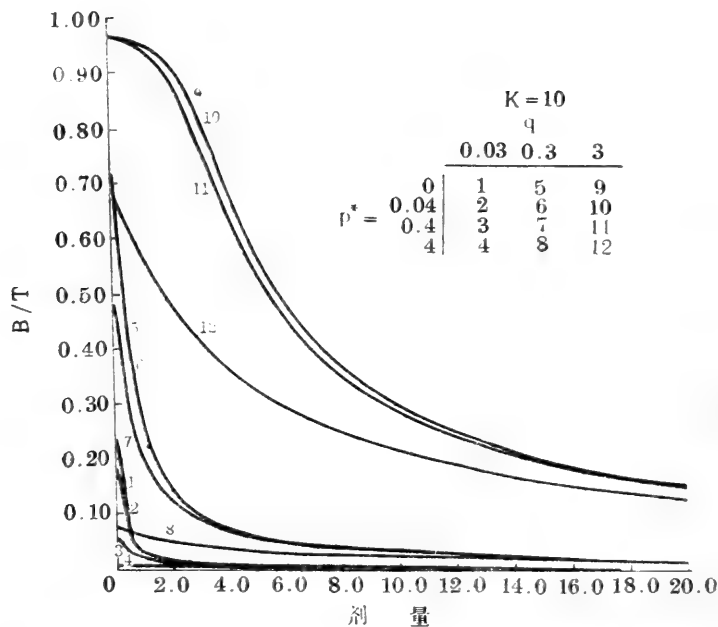


图4 当抗体的总浓度 q 和示踪物浓度 P^* 变动时,未标记抗原剂量和示踪物的结合率之间的理论曲线^[7,11]。

二种是 $P^* = \frac{4}{K}$, $q = \frac{3}{K}$ 。这是 Ekins 的原则, B_0/F_0 将总是 1, 它兼顾了灵敏度与精密度。其特点是使用比第一种方法显然高的浓度。第三种是

$$P^* \sim \frac{1.3 \times q}{K}, \quad q \sim \frac{50}{K}。$$

其特点是高浓度的结合剂和适度过量的 P^* , 假如 $P^* < q$, 检定系统将不能工作, 因为在 P 为零剂量时, 结合剂 q 将未被饱和, 直到 P 增加到使 q 充分饱和后, 才能测定, 所以, 低浓度的 P 将不能检出。

对前二种类型, 实践已证明它们具有较高的灵敏度, 但也都要求 P^* 具有高的比放射度。当待测物的克分子浓度和抗体 K 值的倒数相近时, 它们是较适用的。第三种的灵敏度较低, 但对 P^* 比放射度要求不高, 可测定的范围较宽。

2. 实验探求最佳条件

最主要的条件是合适的抗血清与 P^* 的工作浓度。为了达到较高的检测灵敏度, 选用高比度的 P^* 是有利的。通常加入 P^* 的计数大致为 6000~10000cpm/管。而加入 P^* 的量应大致同最低检出量相近, 所以当 P^* 比度较低时, 势必只能降低加入的 cpm 数, 同时, 相应地延长计数时间, 以使计数误差仍然符合要求。为了兼顾 RIA 的灵敏度和精密度, 应选择适当的抗血清工作稀释度, 通常使零剂量标准管的 $B_0/T_0\%$ 值在 33~60% 间的某个水平。竞争抑制曲线的工作区域, 要尽量与样品中待测物含量高低的范围相适应。

3. 非特异性干扰

RIA 中, P* 与 P 对抗体的结合及竞争抑制作用是在一定的培育介质中进行的,缓冲液组成及在待测样品中的非特异性因素,可能影响 P、P*、抗体的活性,抗原-抗体的一级反应速度及最后的 B、F 分离步骤。反应时缓冲液的种类、pH、离子强度、保护蛋白的浓度,样品中的抗凝剂(如肝素)、溶血、血浆蛋白酶、补体、内源性结合蛋白或抗体等,对各个特定测定物及各个抗血清可能存在着程度不等的效应,决不能忽视。玻璃或某些塑料,往往非特异性地吸附抗体、半抗原,对疏水性半抗原尤其明显。应选用合适容器和吸管。在溶液中加入低浓度的(1~3%V/V)有机溶剂,如甲醇、乙醇,少量与待测样品同种的或异种的血清,或最常见的加入最终浓度 1~5 毫克/毫升的牛(或人)血清白蛋白、卵白蛋白、溶菌酶或明胶等等,都有助于减少非特异性吸附以及高度稀释的抗原或抗体的变性。但不能不加识别地随意使用蛋白试剂,要警惕这些添加物本身是否存在干扰因子。像白蛋白就可能引起非特异性结合,还常杂有蛋白酶活性。如果孵育时间长至 3—4 天,通常应加防腐剂,如叠氮钠(0.1~0.2%)、硫柳汞(0.02%)或洗必泰(0.002%)。

由于小肽易被蛋白水解酶快速水解,常常出现较严重的孵育损伤。当直接用血浆作测定时,更应充分考虑这一点,适当使用酶抑制剂,如金属螯合剂,巯基结合剂、抑肽酶等往往是必要的。Hunter 曾提出一个较好的实验设计,可以发现,培育过程中缓冲液、血浆等对 P* 的损伤及对抗原-抗体的结合和分离步骤的影响^[42]。我们将该法列成表格,可供参考(表 3)^[53]。

表 3 PELH、血浆对测定过程中 AngII* 孵育损伤、抗原-抗体结合及分离步骤的影响^[53]
A. 实验设计: 组别及各天的处理(加入试剂量同常规法)

			孵育过程中的处理			
			第一天	第三天	第五天	第六天
组 别	I	a	PELH + AngII*	+Ab	+NRS + AAb	离心分离及测定 $\frac{b}{t}\%$
		b	同 I _a + P	+Ab		
	II	a		PELH + AngII* + Ab		
		b		同 II _a + P		
	III	b		同 II _a	+P + NRS + AAb	

注: P 为血浆, Ab 为抗血清, NRS 为正常兔血清, AAb 为双抗体,实验结果及其组间统计比较表参见原文。

在 RIA 中要求样本测定管及标准曲线管的组成尽可能相同,不然的话,往往在培育及分离过程中带来误差。在标准曲线管中,加入“去激素血浆”(最好是同种属的)常是一种解决手段。它的制备可有多种方法,如血浆预保温自身降解,物理吸附,动物切除相应的内分泌腺后采血及特异性最强的免疫吸附法等。Carter 曾专文介绍活性炭吸附制备去激素血浆的方法^[54]。

六、B、F 分离系统的选择

由于抗原抗体复合物的浓度很低,单独不能形成沉淀,因此必须采取适当方法达到

表 4 一些分离系统的优缺点^[14]

方 法	优 点	缺 点
1. 双抗体技术	1. 通用 2. 分离完全 3. 对介质中蛋白浓度的改变不敏感 4. 便于自动吸量 5. 计数抗体结合部分容易通过标准程序计算机操纵	1. 第二抗体价格高 2. 在第二次孵育时有再建新平衡的可能 3. 离心时间较长
2. 活性炭吸附技术	1. 通用 2. 非常价廉和快速 3. 适用于任何孵育体积 4. 离心后是结实的和可见的沉淀	1. 要求恒定的接触时间 2. 每批活性炭的亲合力可能有变化 3. 分离不易完全 4. 对总蛋白含量的改变极为敏感 5. 活性炭浆需特殊的吸量系统 6. 不能预测标记物的行为
3. 有机溶剂沉淀 抗原抗体复合物	1. 价廉、快速 2. 适用于任何孵育体积 3. 特别适用于像尿或抽提物那类低蛋白含量样品 4. 适用吸移机械	1. 对总蛋白或 pH 的改变非常敏感 2. 沉淀物的物理性质较不稳定 3. 盐析时标记抗原的非特异性共沉淀
4. 离子交换树脂	1. 用于高极性抗原 2. 特别适用于固相联结	1. 时间依赖性 2. 非特异性结合 3. 不能预测损伤标记物的行为
5. 电泳分离	1. 允许孵育介质的详细分析 2. 损伤组分的分析 3. 对新 RIA 的开发是理想的	1. 费力的方法 2. 价格高 3. 计数时间的高要求 4. 受孵育体积的限制 5. 新平衡的重建(除非使用高压)
6. 第一抗体结合 至试管上	1. 快速、简易 2. 分离完全 3. 不需离心 4. 对小实验室是理想的	1. 依赖于商品的供应 2. 联结过程中可能损伤抗体 3. 价格高 4. 涂复试管需小心保存

B、F 的尽可能完全的分离。一些常用方法的优缺点见表 4^[55]。

在理论上及实际上能最广泛地应用的是“双抗体”技术。此法分离完全,特异性强,重复性好,适用范围广。双抗体结合硫酸铵、硫酸钠、聚乙二醇、葡聚糖或乙醇后,可以加速免疫沉淀,在十多分钟到一小时半完成分离,并节省双抗体的消耗^[9,27]。然而,这个方法需制备和挑选适用的双抗体,并通过实验决定最优使用条件^[12,53]。

活性炭吸附及聚乙二醇沉淀等法也获广泛应用,但应充分注意血浆蛋白等的非特异性干扰以及对反应系统的平衡有否扰乱。其他尚有磁性炭、微胶囊包裹抗体、毛细层析管,双抗体固相管等新方法。

至今没有一种分离法对所有的检定系统都是满意的,或对每个使用者的实验条件都是适用的。每一种方法都要求仔细考察,以决定它在各具体 RIA 中的优缺点。

七、其他有关问题

1. 标准品

随着近代肽合成技术的发展,结构已知或已被假定的小肽几乎均可人工合成。在大多数情况下,最好的合成肽是相同于或更纯于从自然来源分离到的肽。在合成过程中“错误肽”(error peptide)是十分容易产生的,还可能混有残留的短肽或氨基酸。对用固相法合成的肽尤应注意。此外,在商品制剂中往往加有赋形剂、稳定剂等,还必须警惕在冻干、运输及贮存期间可能发生的变化,特别是氧化与聚合。所以在用于检定系统前,应进行该肽的多种物理化学(如电泳、各种层析等)及生物活性的鉴定。

标准品是 RIA 定量报告的“基准”,它应具有最好的纯度和生物活性,并在免疫化学上必须和在未知样品中的待测物相同。各批号标准品间可能存在相当大的差异。只要有可能,应和国际标准相对照。一般来说,如贮存得当,小肽还是比较稳定的。当没有足够的符合条件的“标准”时,也可用“工作标准”来进行相对的比较性度量。

2. 待测样品的处理

众所周知,肽类激素在蛋白酶的作用下极易降解,同时又可从其前体裂解而产生,体内还可能存在免疫学上交叉反应物及其他干扰物质。另一方面,由于样品中肽激素浓度通常很低,甚至低于 RIA 的检出极限。因此,对于待检样品必须控制采样条件,选用适当方法立即终止酶反应,保持低温操作,并且往往还不能省掉抽提等样品处理步骤。方法的选择决定于样品的来源、干扰物质及酶的量 and 性质及待检肽的浓度等。在处理过程中,必需避免过剧的条件,防止酶激活或肽变性及吸附等。应警惕在样品中的干扰物也可能同时被抽提浓集。

以 Bra. 为例, Bra. 在血中的半衰期短于 1 分钟,其前体——激肽原、十肽激肽,以及去 9 位精氨酸-Bra 等代谢物,都与它有化学上和免疫学上的相似性。血浆样品中或用作试剂的抗血清中的激肽原,在蛋白酶作用下可能产生或降解 Bra.。Goodfriend 等比较了各种酶抑制剂的效果,还列表综合了各作者设计的处理样品的流程^[56]。采用了诸如用冷注射器快速采血,加酶抑制剂,酸化,离子交换,吸附,乙醇沉淀,盐析,有机溶剂抽提、浓缩等方法(图 5)。他们指出,应通过实验来评定最可取的程序。

如果选用高亲和力及高特异性的抗血清,有效的酶抑制剂,最好的孵育、分离条件,建立了高度灵敏及特异的 RIA,就有可能实现直接用液体或组织抽提液进行肽类激素的测定(如血浆中 AngII^[53]),其优点自不必多言了。

3. 肽 RIA 及与生物测定法对照问题

RIA 的高度特异性表现在甚至可以区别一个氨基酸差异的二个肽^[23],如甲硫氨酸脑啡肽与亮氨酸脑啡肽^[32]。但是也经常发现,对该测定物的前体或代谢物,以及与它有密切关系的抗原等,存在着程度不等的交叉反应。Yalow 列表总结了在多肽 RIA 中,由于存在着激素性交叉反应,或多种非激素性因子可能引起的非特异性效应^[6]。当生物检定值与免疫检定值间不相符合时,可有多种原因^[5]。应分别探查。

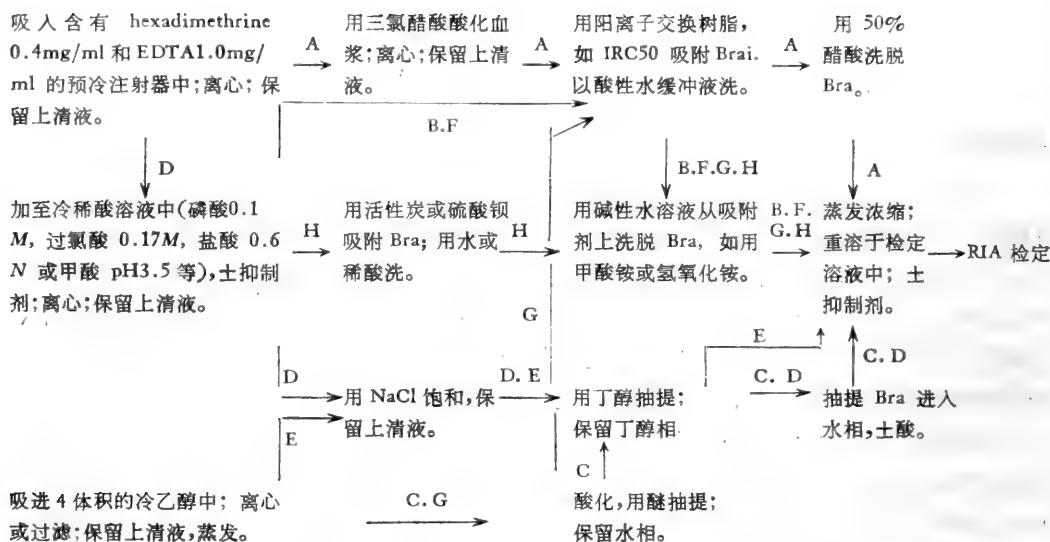


图 5 舒缓激肽 (Bra) 放射免疫检定的样品(血)制备综合流程图^[54]。

A→H 示各家流程,±表示加或不加酶抑制剂。可见,对于某种样品可能采用多种处理步骤。

4. 肽 RIA 的方法学评价

肽 RIA 方法学评价可从灵敏度、精密度、特异性、正确性、稳定性等方面加以考察。未经充分评价和可靠质量控制的 RIA,并不可靠,决不应该盲目使用。Cerceo 等介绍的“效点系统”(Power-Point System),从五个方面对 18 种 RIA 法评分作估价,很有参考意义^[53,57]。

5. RIA 的自动化

新型 RIA 自动仪器的加速应市,及计算机的广泛应用于资料处理,大量地节省了劳力,保证了测定的精度。但是常引进未完全肯定的资料转换步骤,因而也可能存在这类新的误差。

6. 肽 RIA 的前景

至今出现了不少 RIA 方法的变种,如免疫放射分析法,反向滴定法以及放射受体分析法等,此外,许多非同位素分析法如酶免疫分析、荧光免疫分析、病毒免疫分析、自旋免疫分析,血球凝集抑制反应以及定量细胞化学技术等也相继出现,并部分取代了 RIA。但就检定的灵敏度而论,目前仍以 RIA 较高。多肽激素主要也还是用 RIA 法测定。几乎所有已肯定存在的或结构已知的多肽激素都建立了 RIA 测定(参见表 1)。

由于 RIA 具有突出的灵敏度(可度量至毫微克~微微克级)。特异性,测定时操作简便及相对地快速,易于自动化,加之药箱已普遍生产,因而 RIA 得到迅速的发展。在我国,它的发展也很快^[8,13,16,58]。仅在 1979 年全国竞争放射技术交流会上已介绍的小肽 RIA 有: AngI、AngII、Gastrin、GnRH、L-Enk 和 M-Enk 等,不少激素如 ACTH, Glucagon、Bra、C 肽、P 物质、TRH、Secretin 等也正在建立之中。此外,还值得提出的是:在文中所提及的一些内容,即使被简单化地评述成“优缺点”,实际上它们往往并不是绝对化的,也不是一成不变的。因而,过早地把一些“经验”视为规则,盲目照搬是不够慎重的。在具体

工作中,以一些基本概念作指导,多作尝试,逐步改进,常是建立一种优良的 RIA 的必经途径。

随着肽类激素研究的进展、小肽 RIA 也将不断地扩展,其技术本身也会有所发展及创新。

参 考 文 献

- [1] Yalow, R. S., *Science*, 1978, **200**, 1236.
- [2] Chard, T., *An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques. (Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology)*, 1978, 6, part 2, Work, T. S. & Work, E. (eds.), Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
- [3] Krause, D. K. et al., *Radioimmunoassay-Renin-Angiotensin, Principles of Radioimmunoassay and Their Application in Measuring Renin and Angiotensin*, 1978, Georg Thieme Publishers, Stuttgart.
- [4] Abraham, G. E., *Handbook of Radioimmunoassay (Clinical and Biochemical Analysis)*, 1977, 5, Marcel Dekker Inc., New York.
- [5] 镇目和夫、熊原雄一,新版ラジオイムノアッセイ, 1977, 朝倉書店株式会社, 東京。
- [6] Yalow, R. S., *Methods in Radioimmunoassay of Peptide Hormones*, 1976, North-Holland Pub. Co., Amsterdam.
- [7] Parker, C. W., *Radioimmunoassay of Biological Active Compounds*, 1976, Prentice-Hall Inc., New Jersey.
- [8] 放射免疫分析及其他放射体外测定方法编辑室,放射免疫分析及其他放射体外测定方法(1975 年会议资料选编), 1976, 原子能出版社, 北京。
- [9] Pasternak, C. A., *Radioimmunoassay in Clinical Biochemistry*, 1975, Heyden & Son Ltd., London.
- [10] Odell, W. D. et al., *Principles of Competitive Protein-Binding Assays*, 1971, J. B. Lippincott Co., Philadelphia.
- [11] Kirkham, K. E. & Hunter, W. M., *Radioimmunoassay Methods*, 1971, Churchill Livingstone, Edinburgh.
- [12] Hunter, W. M., *Radioimmunoassay, Handbook of Experimental Immunology*, Vol. 1: Immunochemistry, 1979, 3rd ed., Weir, D. M. (ed.), Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- [13] 王世真,竞争放射分析 1981, 原子能出版社, 北京。
- [14] Rehfeld, J. F., *Problems in the technology of radioimmunoassay for gut hormones, Gut Hormones*, 1978, Bloom, S. R. (ed.), Churchill Livingstone, Edinburgh.
- [15] 入江実他, *Radioisotopes*, 1978, **27**, 112.
- [16] 中国医学科学院第七研究室,同位素技术及其在生物医学中的应用, 1977, 168, 科学出版社, 北京。
- [17] Collins, W. D. et al., *Mole. Aspects. Med.*, 1976, **1**, 27.
- [18] Goldsmith, S. J., *Sem. Nucl. Med.*, 1975, **5**, 125.
- [19] Felber, J. P., *Methods of Biochemical Analysis*, 1974, **22**, 1, John Wiley & Sons, New York.
- [20] Haber, E. & Poulsen, K., *The Antigens*, 1974, II, 249, Academic Press. Inc., New York.
- [21] Zettner, A., *Clin. Chem.*, 1973, **19**, 699.
- [22] Skelly, D. S. et al., *Clin. Chem.*, 1973, **19**, 146.
- [23] Chard, T., *J. Endocrinology*, 1973, **58**, 143.
- [24] Yalow, R. S., *Cir. Res.*, 1973, **32** & **33**, Suppl. I, 1.
- [25] Talamo, R. C. et al., *Bradykinin Kallidin and Kallikrein (Handbook of Exp. Pharm.)*, 1979, **25**, Suppl., 301, Erdős, E. G. (ed.), Springer Verlag, Berlin.
- [26] 陆以信等,生物化学与生物物理学报, 1977, **9**, 363.
- [27] Kao, P. C., *Clin. Chem.*, 1973, **25**, 1267.
- [28] 中国科学院上海生物化学研究所多肽激素组等,生物化学与生物物理学报, 1977, **9**, 105.
- [29] Talamo, R. C. et al., *J. Immunol.*, 1968, **101**, 333.
- [30] Erlanger, B. F., *Pharm. Rev.*, 1973, **25**, 271.
- [31] Haber, E. et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1969, **29**, 1349.
- [32] 陆以信等,生物化学与生物物理学报, 1980, **12**, 117.
- [33] 陆以信等,抗徐缓激肽抗血清的制备,竞争放射分析技术, 1981, 原子能出版社, 北京。
- [34] 李迪元等,生物化学与生物物理学报, 1979, **11**, 353.
- [35] Goodfriend, T. L., *Science*, 1964, **144**, 1344.
- [36] Vaitukaitis, J. et al., *J. Clin. Endocrinol.*, 1971, **33**, 988.

- [37] 中国科学院原子能研究所,放射免疫的质量控制,1979年全国竞争放射分析技术交流会交流资料,无锡。
- [38] Steward, M. W., *Immunochemistry* 3rd ed. (Handbook of Experimental Immunology), 1979, 1, Chapt. 16, Blackwell Scientific Pub., Oxford.
- [39] Taussig, M. J., *The Immune System: A Course on the Molecular and Cellular Basis of Immunity*, 1978, Chapt. 4, Hobart, M. J. & McConnell, I. (eds.), Blackwell Scientific Pub., Oxford.
- [40] Miller, J. A., *Science News*, 1978, 114, 26.
- [41] Nielsen, M. D. et al., *Acta Endocrinol.*, 1971, 67, 104.
- [42] Skima, K. et al., *Endocrinology*, 1975, 96, 1254.
- [43] Thorell, J. I. et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, 251, 363.
- [44] David, G. S., *Science*, 1974, 184, 1381.
- [45] Donabedian, R. K. et al., *Clin. Chim. Acta*, 1972, 36, 517.
- [46] Bolton, A. E. et al., *Biochem. J.*, 1973, 133, 529.
- [47] Hayes, C. E. et al., *Anal. Biochem.*, 1975, 67, 580.
- [48] Wood, S. T. et al., *Anal. Biochem.*, 1975, 69, 339.
- [49] Herbert, V. et al., *J. Clin. Endocrinol.*, 1965, 25, 1375.
- [50] Mitchell, G. A. et al., *Immunochem.*, 1974, 11, 611.
- [51] Goeke, D. J. et al., *Cir. Res.*, 1969, 24 & 25, Suppl. I, 131.
- [52] Schönesöfer, M., *Clin. Chim. Acta*, 1977, 77, 101.
- [53] 陆以信等,生物化学与生物物理学报, 1978, 10, 279。
- [54] Carter, P., *Clin. Chem.*, 1978, 24, 362.
- [55] Hadam, W. R. et al., *Radioimmunoassay-Renin-Angiotensin, Principles of Radioimmunoassay and Their Application in Measuring Renin and Angiotensin*, 1978, 27, Georg Thieme Publishers, Stuttgart.
- [56] Goodfriend, T. L. et al., *Method of Hormone Radioimmunoassay*, 1974, 439, Jaffe, B. M. & Behrman, H. R. (eds.), Academic Press, New York.
- [57] Cerceo, E. et al., *Lab. Pract.*, 1974, 23, 625.
- [58] 放射性同位素在基础医学中的应用编辑组,放射性同位素在基础医学中的应用, 1979, 原子能出版社, 北京。

常用细胞免疫方法的讨论

谢少文

(中国医学科学院基础医学研究所)

- | | |
|---------------|---------------------------|
| 一、前言 | 四、今后研究的方向 |
| 二、体内细胞免疫的方法 | 1. 效应细胞的分离提纯问题 |
| 三、体外试验的几种常用方法 | 2. 细胞上可能有吸附的活性介质或抗体的可能作用 |
| 1. 玫瑰花结试验 | 3. 不同细胞周期, 可能表现有不同标志及不同产物 |
| 2. 淋巴细胞转化 | 4. 细胞免疫反应的定量问题 |
| 3. 测定淋巴因子的方法 | |
| 4. 细胞毒试验 | |

一、前言

现在研究免疫反应的工作者,对于细胞免疫,发生了极大的兴趣。因为大家都了解细胞免疫,它既是机体免疫反应性的基础,又提供针对病毒感染、细胞内细菌感染以及移植排斥及肿瘤免疫的主要效应细胞。现在,已有的体内及体外的方法,在动物实验中已经成功,但经过多少年临床病人中的试用,发现还有许多不足之处。例如:大多数方法要求用血量,且手续繁,结果的特异性不够高,敏感性又较低。还有一些方法,结果的数字并不能代表量的改变;甚至有些方法,如吞噬试验,对方法的要求,以及结果的分析都存在问题。一般是常用吞噬细胞的百分数,以及吞噬指数,作为免疫的指标,而实际上,早在20年代,苏联的免疫学工作者已经指出,机体的免疫性,应当用完全吞噬反应,即被吞噬微生物的是否消灭作为指标。这样对于现有的测定细胞免疫的方法,仍需加以不断的改进,以便有一天能够为临床工作更好地服务。本文的目的,是对临床上比较常用的几种细胞免疫的测定方法的优缺点,作一个比较全面的估价,使读者对于当前存在的问题有所注意,并且设法解决或进一步提高,使细胞免疫可以同体液免疫一样,会解决临床上有关疾病的诊断,并能反映出机体的特异性免疫反应和非特异性免疫反应性。

必须指出,这次的分析只是初步的,因为作者对于绝大多数方法,没有感性认识,所举的一些例子,也只用来说明一个问题。主要是想利用国内的一些报道,以便指望大家注意到存在的问题,在实践中不断有所提高,使方法更加完善。

二、体内细胞免疫的方法

这类方法已有很长的历史。过去主要是用作为某些传染病及寄生虫的诊断,分析某一个地区各种流行病的情况,以及注射疫苗后效果的观察。例如结核菌素皮肤试验对两岁以下的幼儿,有很高的诊断价值。在这个年龄组中,阳性反应,对诊断结核感染有辅助意义,而阴性反应,基本上可以排除本病的可能性。此外,接种卡介苗后,对疫苗的反应,

可用结核菌素阳性而得到证实。又如麻风菌素试验,不但可以诊断结核样型麻风,而且可以诊断出瘤型麻风细胞免疫阴性的存在。其他微生物抗原,如病毒抗原、真菌抗原、寄生虫抗原,甚至有一些肿瘤抗原,或多或少地有类似的作用。

近年来,有许多微生物的皮试抗原,已转而用于测定机体非特异性细胞免疫的方面。由于人们在生活过程中,或多或少地同这些微生物相接触,自然产生了免疫,而且主要是产生了细胞免疫。这样,当用其中任何一种抗原进行试验时,如出现阳性皮肤试验,就可以作出机体的细胞免疫反应正常的结论,反之则是低下的结果。但这些方法,当然不能辨别机体对从来没有接触过的抗原,是否有无细胞免疫反应。为此,现在进一步用一类过去没有接触过的化学制剂,如二硝基氯苯(DNCB),先进行致敏接种,以后过二周后,再进行皮肤试验。正常人在实验时,应当出现阳性反应。如果出现阴性反应可以证明这个个体不能在当时用DNCB来诱导出细胞免疫,也不能产生阳性反应。因此这是一种更加敏感的实验,能更好地表示出机体的细胞免疫反应性。

最近国内比较更广泛地采用一种植物血凝素(PHA)^[2]或伴刀豆蛋白A进行皮试。这类试验,不需要事先致敏,即可以反映出机体的细胞免疫反应性。而且可以多次进行,不会改变机体的反应强度。这就可能对同一患者,多次注射而观察其反应的动态。国内许多单位,大半应用广州市医药工业研究所的制品,但发现在同一个剂量(10 μ g)的皮内注射时,红晕的直径或高到20mm,或小到4mm,这些差异,很可能是由于各批制品的效价不同,也可能因为一般只用促淋巴细胞转化的能力,作为PHA的标准。也许由于各人的注射深浅或观察结果时所出现的误差所造成的^[2]。此外,我们也发现,注射PHA后观察结果的时间也有关系^[3]。在比较少数的试验中,八小时的观察,一般已达到最高的反应,而且硬结更容易看到。这也指出尚有进一步研究PHA皮试的必要。

至于为什么在八小时即可以看到反应的最高峰?我们认为这可能是由于PHA能在较短时间中,促使大量的淋巴细胞分泌出淋巴因子。通过趋化因子的作用,使各种血细胞集合在注射部位,又通过皮肤反应性因子,使血管渗透力增加,体液外流,形成局部病变。因为不必像抗原那样逐步增加刺激致敏的淋巴细胞,时间就可以缩短。如果八小时结果得到证实,就可以较早地得到皮试结果,也可能早期进行治疗。此外多次注射不会影响结果,就便于追随同一病人细胞免疫反应性的动态观察。缺点是到现在还没有一个很方便和准确的标准化的方法,因此每次换一批试剂,最好是在同一受试者,进行新旧两种试剂的对比,以免出现过大的差距。此外PHA皮试不容易出现低反应或阴性反应,也是一个不足之处,尚待进一步提高其敏感性。

在采用皮试时,国外常同时用四、五种试剂,以免受试者对过去所没有接触过的抗原而出现假阴性。但是国外分析结果的方法,常以对几种抗原反应而判断强度。例如一个受试者对五种抗原有阳性反应,则认为是强阳性,对二种试剂有反应,则认为是弱反应。这样判断,尚看不出有何根据。我们认为,要进行定量试验,最好采用一、二种抗原的各种稀释液。这样可能得到更好的前后的比较。举例如:天津人民医院^[4]所采用的结核菌素及链球菌的两种酶(链激酶及链道酶)进行定量稀释。对一些肿瘤病人治疗后五年时间进行几次试验。结果活存的病人上升较多而死亡病人反应不变或下降较多。我们认为,像这样一类的研究值得进一步进行。

总之,在今天体外试验,尚未能在临床常规地应用时,适当地运用皮肤试验,可能为临

床研究细胞免疫,提供一定的有用的数据。

三、体外试验的几种常用方法

在动物实验中,体外方法是研究细胞免疫的主要措施,因为皮肤反应,或是动物对它不太敏感,或者不好衡量,因此主要采用体外的方法。这方面的方法很多,常用的是: E 玫瑰花试验,测定 T 细胞数和功能;淋巴细胞转化试验,测定 T 细胞功能;移动抑制及白细胞粘附抑制试验,测定 T 细胞产生淋巴因子的能力等。近年来又出现了一种比较鉴别性的酯酶组织化学的测定,来作 T 细胞计数^[5]。初步看来,方法比较简便,用血量少,而且各种动物都可以用同一种方法。如果不断改进,将有助于临床细胞免疫学的研究工作。

这个方法是 1975 年首次提出来的。其原理乃是酯酶在几种免疫细胞中的分布及表现有所不同。当用 α 醋酸或丁酸萘酯酶 (acid α naphthyl acetate/butgrate esterase) 加上其底物,六偶氮副品红后,可出现三种不同的结果: T 细胞中出现少数大而红色的颗粒, B 细胞中不出现颗粒,而巨噬细胞中有弥散性的微小红颗粒出现。用本法在人周围血中,可得到约 70% 左右的 T 细胞。这个结果与玫瑰花试验结果相似。它的应用在组织切片中可能更有前途,可以分析组织中 T 细胞的含量。

其他比较常用的体外细胞免疫方法有:

1. 玫瑰花结试验

这是在实际工作中,特别是在临床试验中,进行得最多的一种方法。同时,它又是变种最多的一种试验。

现在常用的玫瑰花试验,有活性及总花结数试验,较少用的有 29 度试验及 37 度试验。Wybran 首先指出,由于做活性花结试验的条件不利于形成玫瑰花结,因此只有结合力强的 T 淋巴细胞,才有形成的能力。平均正常值只有 25% 左右。因而容易反映出 T 细胞的功能。例如在肿瘤的晚期,经过免疫抑制剂的使用,活性花结低于总花结数。也有证明在 29℃ 形成花结,基本上同活性一样,同样可以表示出 T 细胞的功能。在 37℃ 时,大部分淋巴细胞或不形成花结,或形成后又出现分解。只有结合力最强的才能保存下来。在慢性活动性肝炎、某些白血病、麻风病人中却有一部分 T 细胞仍能形成^[6]。因此适当地利用不利的影响因素,可能更好地发挥这个试验的特点。

如果在进行花结试验之前,先用有丝分裂原,预先同淋巴细胞一起培养 24 小时,再做花结试验,发现花结较大,而且百分数也有所增加。这说明激活的 T 细胞能形成更多的花结。有人进一步取致敏病人的淋巴细胞加上相应抗原,孵育二小时,不论进行活性花结试验,或在 37℃ 进行,都发现抗原对致敏的 T 细胞能增加玫瑰花的形成。这就为特异性花结提出一个可能,而更扩大了花结试验的应用范围。由此看来,花结试验是很有前途的。我们必须努力找出各种影响因素,想办法使条件一致,这样,可使这一种非常简便的体外细胞免疫试验,能有效地用之于临床。

2. 淋巴细胞转化

淋巴细胞在周围血流中,是处于静止的状态。有许多有丝分裂原 (mitogen) 如豆类

蛋白、花生蛋白,甚至动物组织液如蜗牛蛋白及脂多糖等,或作用于T细胞,或作用于B细胞,有的作用于两者。这就提出来作为研究T或B细胞非特异功能方法之一。此外,对致敏的淋巴细胞,不论在体内或体外致敏,相应抗原也能激活它们,使它们分裂,而转化成为母细胞,作为一种特异性细胞免疫的测定方法。结果的判断,可用形态学的方法,或用同位素标记的胸腺嘧啶或尿嘧啶的参入DNA或RNA,作为有丝分裂的标志。两种测定方法各有利弊,但后者可避免主观因素,可以半自动化,也是更正确定量的一种方法。因之,有条件的单位,最好采用参入法。

开始研究时以为抗原与有些有丝分裂原,如植物血凝素,单纯地激活T细胞。在文献中已有大量这样应用的报道。随着研究的不断深入,现在知道,这个差异是有条件的,只有在液相时,PHA单纯作用于T细胞,而在固相时,PHA也能刺激B细胞。此外,在T细胞激活后,很快放出各种淋巴因子,其中有促分裂因子,也可使B细胞分裂。这就减低了这个试验对于混合淋巴细胞时的正确性。

此外,有不少试验证明,PHA的用量,可激活不同的细胞。如果用量太大,又可出现抑制作用。而且每个人的反应又是不同,甚至同一个体,在不同时间,对PHA反应也不完全相同。这样,尽管有许多试验,报道了在各种临床例子,发现淋巴细胞分裂的百分数,好像反映了机体的非特异性或特异性的细胞免疫。但从量的角度来看,尚有进一步改进的必要。

我们认为应当进一步在分离出纯T细胞的条件下,进行非特异或特异性转化试验。必要时,要加上一定量的巨噬细胞,作为测定T细胞功能的方法。但至今尚没有看到这样试验的报道,也请读者考虑。

当然在动物试验中,或在体外试验中,当所用淋巴细胞是从某一个动物体内获得的,这个方法仍有一定的价值。

3. 测定淋巴因子的方法

当有丝分裂原或抗原作用于淋巴细胞时,细胞就被激活而放出淋巴因子,因此测定一种激活后淋巴因子的活性,也已被采用作为细胞免疫的指标,比较常用的有白细胞或巨噬细胞移动抑制试验,白细胞趋化因子的测定,以及白细胞的粘附抑制试验。这些方法虽有不同难度,影响因素也较多,但其主要不足之处,仍在于淋巴因子,不但T细胞能产生,B细胞也能分泌。而且这些方法最多是半定量试验,不容易比较一个个体,在治疗前后的增长或减低,也不能比较不同个体间的免疫反应性。因此对于这类试验,分析结果时必须慎重。

进行淋巴因子测定时,必须特别注意对照试验,因为所测材料是一个混合物,有淋巴因子,还有抗原。必须有一个没有淋巴因子而有抗原的对照。此外靶细胞的存活又是本法的基本要求,有可能时应当进行抑制解离试验,即将游走时间延长,观察抑制能否解除。但在实际工作中,已经有不少工作,看来能反映出一部分细胞免疫,以及作为某些肿瘤病人的诊断。现在将比较四种常用细胞免疫方法,列于表,以供参考^[7]。

以上结果不一定就是最好的结果,但可以用来比较MIF和LAI。如果我们以特异性玫瑰花结和淋转为准,可见从特异性来讲,后二者与前者相差不远,但从敏感性来讲就差一些了。另外有其他报告,也提出其敏感性也较低,只有50~60%阳性,因而这两种方

胃癌抗原测定病人的免疫反应

病人组别	特异性玫瑰花			淋转试验			移动抑制试验			粘附抑制试验		
	例数	>16% 的病例数	阳性率	例数	>30% 的病例数	阳性率	例数	>85% 的病例数	阳性率	例数	>10% 的病例数	阳性率
胃 癌	30	28	93	28	24	86	15	11	73	19	16	84
其 他 癌	51	8	16	20	3	15	12	4	33	33	6	18
非 癌	48	5	10	10	2	20	12	3	25	37	4	11
正 常 人	30	1	3	17	1	7	12	1	8	10	0	0

法,在进一步应用中尚有提高的必要。

必须指出 LAI 有一特点是其他实验所不能相比的,就是可用此法能较方便地测出肿瘤病人血清中的封闭因子。封闭因子的性质尚不清楚,但它的出现可能作为某些肿瘤扩散的证据。

4. 细胞毒试验

在动物研究中常用各种细胞如T细胞、K细胞(依赖抗体的细胞毒试验)、天然杀伤细胞以及巨噬细胞等,都进行了大量的工作。在临床上也有所采用。从免疫功能来讲,细胞毒活性试验,应当能够更好地反映出个体的细胞免疫反应性。但从实际出发,由于细胞毒试验要求较多的对照,因而血量要大,手续比较繁,又要一定的培养时间,效应细胞与靶细胞的比例,又同体内大不相同(比例常为 50:1, 100:1, 甚至 500:1)。而且一般说来,特别是T细胞的杀伤作用,其特异性不够好。因此今天已少用于临床研究。

四、今后研究的方向

根据上述的结论,我们认为要在今天将体外细胞免疫测定方法用于临床,还应将进行大量的工作。主要有下列几方面:

1. 效应细胞的分离提纯问题

由于在各种方法中,所检测的结果,往往不单是T细胞所产生,因此现在所得到的,只能代表单核样细胞的表现,而不能肯定其代表T细胞。从这个观点出发,建议考虑首先分离单纯的T细胞,加上必要的巨噬细胞,并做好适当的对照。例如单纯巨噬细胞,在本试验中,能产生什么结果。这样做,肯定要加大用水量以及使手续更繁重。但我们认为进行实验,首先要考虑的是准确的结果,以后再进一步加以简化或减少血量。

2. 细胞上可能有吸附的活性介质物或抗体的可能作用

特别要注意抑制物的因素。许多实验证明,粗提的细胞,即使洗过三次,仍有部分介质吸附在细胞膜上。有人用六次洗涤法,才能完全洗去。例如B细胞对某些有丝分裂原,并非不起反应,而是T细胞接受刺激物作用时,产生了抑制因子,使B细胞不起反应。

3. 不同细胞周期,可能表现有不同标志及不同产物

如果能够人工地使每个细胞都停留在同一个周期,每次都一样,是否能使结果更加一致?重复性能否提高?这个设想尚待进一步证实。但现在确已知道,不同分化期,细胞是有不同的标志的。

4. 细胞免疫反应的定量问题

这是一个很重要的问题,是提高测定结果,及准确性的重要措施。过去我们设想,淋巴因子是T细胞活动时的产物,那末用生化的方法测定淋巴因子,有可能反映细胞免疫的量的改变。但现在已知道,B细胞,巨噬细胞等,都能产生各种“细胞因子”,而且各种因子的理化性质不同,也可能有抗原性的不同,这就使测定因子复杂化了。现在我们企图通过一种比较特异的受体,或设法使它们全部从细胞膜上分离,或测定血清中已经存在的受体,来代表有这种受体细胞的数量或活性。这个方法,看来尚有希望,希望同行们也进行研究。

参 考 文 献

- [1] 植物血球凝集素用于肿瘤治疗的临床报告及有关研究资料选编,第一集:1977,37;第三集:1980,146。
- [2] 同上。第一集:1977,46。
- [3] 谢少文:江苏医药,1978(10),43。
- [4] 徐维贞:天津中华医学会免疫学学术论文汇编,1978,192。
- [5] 南京铁道医学院:中华医学杂志,1980(3),6。
- [6] 林飞卿等:上海第一医学院学报,1980,7,1。
- [7] 王凯华:北京医学,1979,1,139。

凝集素的性质及其在免疫学上的应用*

孙 册

(中国科学院生物化学研究所)

一、凝集素的生物学效应特征

1. 与糖结合的专一性
2. 血凝作用与血型专一性
3. 促细胞分裂作用
4. 免疫作用

二、凝集素在免疫学中的应用

1. 分离纯化糖蛋白(包括抗原)
2. 血型鉴定
3. 分离和纯化淋巴细胞
4. 用于探索免疫反应机理

凝集素(lectin)是一类具有使细胞凝集作用的蛋白质。在自然界分布很广。

凝集素的发现早在 1888 年 H. Stillmark 研究蓖麻籽提取液对血液的毒性时,第一次注意到这种蛋白质具有使人和动物的红细胞成丛的能力,他称之为蓖麻素(ricin)。不久, H. Hellin 从相思豆提取到另一种蛋白质,也能使红细胞凝聚,他称之为相思豆素(abrin)。人们对这类能使红细胞凝聚的蛋白质曾给过各种名称:因为它们有凝聚红细胞的能力,称它们为血凝素(hemagglutinin),又由于它们最初从植物中分离,又称为植物血凝素(phytohemagglutinin)、植物凝集素(phytoagglutinin 或 plant agglutinin)。以后发现这类蛋白质不仅能凝集红细胞,也能使其他细胞如淋巴细胞、成纤维细胞、精子等凝集。再则,除植物外,某些无脊椎动物如蜗牛、龙虾、螯等和某些脊椎动物如电鳗等体内也存在凝集素。各种凝集素有选择地凝集不同动物的红细胞,有些并具有区别人类血型的能力。Boyd^[1] 根据这些发现首先称这类蛋白质为 lectin (注 1)。近年在哺乳动物的细胞表面如兔肝、小鼠胸腺和脾细胞、人肝细胞,以及禽类如鸡心细胞也发现存在凝集素。它们可能在某些重要的生物学反应或某种病变中起作用。

细胞的生物学行为和生化反应包括细胞间的通讯、细胞生长和分化的调节、细胞的识别和粘着、细胞的免疫作用等,或许也包括细胞的恶变,最初是由细胞表面介导的,特别与细胞膜上糖蛋白和糖脂分子上的糖链有关。凝集素具有对糖专一识别的能力,不同的凝集素可结合不同的糖分子,它们能有选择地与糖蛋白或糖脂的糖链作用,因此凝集素是研究细胞膜结构和功能的极其有用的一类物质。

一、凝集素的生物学效应特征

1. 与糖结合的专一性

凝集素使细胞凝聚、促使细胞有丝分裂和其他免疫学的作用,以及区别不同血型等各种生物活性,均由凝集素与糖专一结合并在一个分子上有多个与糖结合的位点这一性质

* 本文承沈昭文教授提出宝贵意见,特此致谢。

所致。凝集素与糖以非共价键结合,结合力弱且可逆。它们与互补的多糖或糖蛋白间的沉淀反应几乎在各方面与抗体-抗原系统相似。凝集素在其中起抗体作用,多糖或糖蛋白充当抗原。如在抗体-抗原和凝集素-多糖(或糖蛋白)这两个系统中,当一种反应物过量时形成的沉淀通常均会溶解;互补的糖抑制凝集素和多糖或糖蛋白间沉淀的形成与半抗原作用相似。然而凝集素与抗体间也存在显著的差别。首先,抗体是高等动物的免疫系统对进入机体的外界物质的刺激作出应答而合成的,凝集素则作为生物体的组成蛋白质存在。其次,抗体的专一性范围不限于糖,也包括氨基酸、蛋白质、核酸等,抗体只对诱导它形成的抗原专一,而凝集素只对糖专一。其三,各种抗体的结构相似,而各类凝集素在结构上除都是蛋白质外,各不相同。

凝集素与互补的多糖或糖蛋白形成沉淀或使细胞凝集的性质,均表明它每一个分子必须具有至少两个结合糖的位点。如大豆凝集素(简称 SBA)每分子有两个、麦胚凝集素(简称 WGA)有四个结合位点。各凝集素的结合位点大小各不相同,每一位点结合一个单糖或一个寡糖的几个糖单元的互补分子,如 SBA 与 N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)互补^[2],花生凝集素(简称 PNA)的最适互补糖分子是半乳糖- $\beta(1 \rightarrow 3)$ N-乙酰半乳糖胺(Gal- $\beta(1 \rightarrow 3)$ -GalNAc)这种结构的二糖^[3]。凝集素借分子上的这些结合位点与细胞膜上的糖链连接。

研究凝集素的糖专一性的基本方法是“半抗原”抑制。凝集素与糖的专一结合不仅要求一定的糖,并且在构型上也有所要求。伴刀豆球蛋白凝集素(简称 ConA)的结合位点需六原子环中 C-3、C-4 和 C-6 羟基未被取代的 α -D-甘露吡喃糖苷或 α -D-葡萄糖吡喃糖苷^[4],ConA 与糖苷的 C-1 相连接。ConA 并具有与 $\alpha(1 \rightarrow 2)$ 连接的甘露二糖或三糖相互作用的能力。利马豆凝集素(简称 PLA)和 SBA 虽均对 GalNAc 专一,但 PLA 只与 α -构型互补,而 SBA 既能与 α -GalNAc 结合,也能与其 β -异构体结合^[2]。因此两者在血型专一性上也不同^[5]。

2. 血凝作用与血型专一性

凝集作用是凝集素对细胞的许多作用中最易观察的一种,因此血凝反应用作测定凝集素活力的一种方法。继 Stillmark 的发现二十年后,Landsteiner 和 Raubitshek 观察到各种植物提取液的相对血凝活力可因被凝集的红细胞来源不同而相差很大,如小剂量的扁豆凝集素(简称 LCA)使兔红细胞凝集,但即使浓度很高时对鸽红细胞仍无作用。确立了血凝作用具有供血动物种属专一性的观点^[6]。

血凝作用是一种高度复杂的反应。它不仅因不同凝集素和不同的供血动物而异,还受其他因素的影响。主要的有:凝集素的性质,包括结合位点数(即结合价)、结合强度(结合常数)、电荷和分子大小。如二价的琥珀酰 ConA 与细胞的结合效应和四价的 ConA 一样,但凝集羊红细胞的活力只有四价 ConA 的 $1/500$ ^[7]。戊二醛交联的 SBA 凝集人和兔红细胞所需的浓度比未交联的小 $100 \sim 200$ 倍^[8];红细胞表面的性质,包括受体的数目、可近性和分布,如被神经氨酸酶处理的人红细胞表面,结合花生凝集素的位点大大增加,只需要 $0.08 \mu\text{g/ml}$ 的花生凝集素就可使其凝集,而凝集未处理的红细胞的最小浓度在 1mg/ml 以上。经胰蛋白酶处理的人和兔红血球对大豆凝集素的敏感性比未处理的高 $60 \sim 100$ 倍^[9]。基于人红细胞膜上末端为 GalNAc 的红细胞糖苷脂可能是 SBA 的主要

受体来解释胰蛋白酶作用对血凝反应的影响。糖脂的糖链紧接于脂质双层并在糖蛋白的包围中,结合于糖脂的 SBA 被“埋”在细胞表面不能与适当的细胞间形成“桥”,因此不能导致细胞凝集。经胰蛋白酶处理除去膜上糖蛋白伸出在表面的部份,使结合了 SBA 的细胞间能形成“桥”。ConA 和 SBA 对戊二醛固定的人红细胞的凝聚活力比未固定的大,可能是由于固定细胞表面的受体分布有所改变^[10]。某些凝集素还需要某种附加剂,如 ConA、LCA、PLA 等都需有 Ca^{++} 和 Mn^{++} 的存在才显示血凝活力^[11];有的凝集素在生理缓冲液的环境中无血凝活力,需在反应液中加入白蛋白或某种合成的聚合物才显示活力。此外血凝作用也受温度的影响。

血凝作用是凝集素分子与红细胞表面的糖分子连接,在细胞间形成“桥”的结果,因此被与凝集素互补的糖分子抑制。

Landsteiner 和 Raubitshek 不仅观察到血凝反应与供血动物的种属有关,也注意到与供血的血型有关。但直至本世纪四十年代才对凝集素的血型专一性渐渐有了了解。对血型专一性而言,凝集素可分为两类,一类没有血型专一性,但对特定的糖基或糖蛋白和糖脂上的糖链有明确的专一性,如 ConA、SBA 等;另一类有血型专一性。各种凝集素的血型专一性不同(表 1),如 PLA 只凝集人的 A 型红血球而不凝集 B 型或 O 型^[5]。从欧洲百脉根种子提取的凝集素只凝集 O 型红细胞^[12]。*Bendeiraea simplicifolia* 种子中提取的凝集素抗 B 型,但不绝对专一于 B 型血球^[13]。某些凝集素的血型专一性极强,它们能区别血液的亚型,如双花藕豆凝集素与 A_1 亚型红血球的反应比 A_2 亚型的强 500 倍^[12]。*Vicia graminea* 凝集素抗 N 型,与 M 型仅有很弱的交叉反应^[14]。

从同一属的不同种的植物中提取的凝集素的血型专一性可以不一样。如均属巢菜属(*Vicia*)的草藤(*Vicia cracca*)、*Vicia graminea* 和蚕豆(*Vicia faba*)中提取的凝集素的血型专一性不同,草藤对 A 型专一,*Vicia graminea* 对 N 型专一,而蚕豆没有血型专一性^[15]。

至今已研究了血凝活力的 2600 余种植物提取液中,90 种具有人血型专一性,700 余种无血型专一性,200 余种使各型红细胞溶血^[16]。

各种凝集素在血型专一性上的差异是由于它们的糖专一性不同的结果。Watkin 和 morgen^[17] 确立了血型专一性与糖专一性之间的联系。利用“半抗原”抑制,他们指出 PLA 导致的 A 型红细胞的凝集被 $\alpha\text{-GalNAc}$ 有效地抑制,确立了 $\alpha\text{-GalNAc}$ 是 A 型的专一性决定簇。欧洲百脉根凝集素和电鳗血清中分离的凝集素对 O 型红细胞的凝集作用被 L-岩藻糖(L-Fuc)最有效地抑制,证明了 O 型红细胞的决定簇是 L-岩藻糖。B 型红细胞的专一决定簇则为半乳糖。

3. 促细胞分裂作用

使静止的一不分裂的淋巴细胞进入生长和繁殖状态是凝集素在免疫学上的重要作用之一。凝集素激活淋巴细胞的研究始于 Nowell^[18],他发现菜豆凝集素(简称 PHA)能激活淋巴细胞使其生长分裂,而与淋巴细胞受体的抗原专一性无关。以后发现美洲商陆(简称 PWM)和多花紫藤凝集素(简称 WFM)也有促细胞分裂作用。近十几年来陆续发现的具有促细胞分裂活力的凝集素骤增,其中有 17 种已纯化(表 2)。绝大多数凝集素的促细胞分裂作用与血凝作用一样,被互补的单糖或寡糖链抑制。

表 1 若干凝集素的血型专一性

血 型	凝 集 素	专一结合的糖
A ($A_1 \gg A_2$) A	双花藜豆 (<i>Dolichos biflorus</i>) 蜗牛 (<i>Helix pomatia</i>) 利马豆 (<i>Phaseolus lunatus</i>) 草藤 (<i>Vicia cracca</i>) 长柔毛野豌豆 (<i>Vicia villosa</i>)	α -D-GalNAc α -D-GalNAc, α -D-GlcNAc α -D-GalNAc α -D-GalNAc, D-Glc D-GalNAc
A + N	贝壳花 (<i>Moluccella laevis</i>)	
B(B, A + B) B	<i>Bandeiraea simplicifolia</i> 食用小皮伞 (<i>Marasmius oreades</i>) 日本蜆 (<i>Charybdis japonica</i>) 矶沙蚕 (<i>Eunice kobeensis</i>) <i>Lymantria dispar</i> 木蹄真孔菌 (<i>Fomes fomentarius</i>)	D-Gal
A + B	条纹猪屎豆 (<i>Crotalaria striata</i>) 槐 (<i>Sophora japonica</i>)	D-Gal, D-GalNAc
H(O)	鳗血清 (<i>Anguilla anguilla</i>) 无柄金雀花 (<i>Cytisus sessilifolius</i>) 无毛金雀花 (<i>Cytisus glabrescens</i>) 欧洲百脉根 (<i>Lotus tetragonolobus</i>) 荆豆 (<i>Ulex europaeus</i>) UEA _I , UEA _{II}	L-Fuc. L-Fuc L-Fuc L-Fuc (D-GlcNAc) ₂
M	蜂宝花 (<i>Iberia amara</i>) 亦称屈曲花	
N	<i>Vicia graminia</i>	抗-N 血清, 牛或羊酪蛋白
Tn	大西洋鲎 (<i>Limulus polyphemus</i>) 日本鲎 (<i>Tachyleus tridentatus</i>) 南欧丹参 (<i>Salvia sclarea</i>)	} NANA, 葡萄糖醛酸
Cad	欧洲益母草 (<i>Leonurus cardiaca</i>) 一串兰 (<i>Salvia farinacea</i>)	

凝集素促细胞分裂的作用受许多因素的影响,主要的有以下几方面: (1)凝集素的促细胞分裂活性具有细胞类型专一性,如 ConA、PHA 只激活 T 细胞、PWM 既激活 T 细胞也激活 B 细胞。但是 ConA 或 PHA 可使混合的 T 细胞和 B 细胞中的部分 B 细胞激活,这种激活可能是由激活的 T 细胞产生的可溶因子介导。再则, B 细胞也可被固定化的 ConA 或 PHA 激活^[19]。同一类淋巴细胞的亚类或亚群对凝集素的促细胞分裂作用的反应亦不同,如小鼠胸腺的未成熟亚群被 ConA 激活而不被 PHA 激活,但两种凝集素均可激活成熟的亚群^[20]。(2)淋巴细胞的来源。凝集素的促细胞分裂作用与它的血凝作用一样,具有动物种属专一性,如 PNA 能激活神经氨酸酶处理的人和大鼠的淋巴细胞而不能激活同样处理的小鼠淋巴细胞使其分裂^[21]。(3)受细胞表面糖结构的影响。用糖苷酶改变细胞表面糖的成份将影响细胞对促分裂原的反应,如 SBA 浓度为 150 μ g/ml 亦不能激活小鼠淋巴细胞使其分裂,但 10 μ g/ml 浓度的 SBA 可使神经氨酸酶处理的这种细胞的激活态达到高峰^[22]。又如 PNA 只激活用神经氨酸酶处理的大鼠和人的淋巴细胞,对未处理的细胞则不起作用^[21]。(4)与凝集素的结合价有关。如二价的 SBA 对任何种类的细胞

表 2 具有促细胞分裂的凝集素

凝 集 素	细胞专一性	
	T	B
相思豆 (<i>Abrus precatorius</i>)	+	+
蘑菇 (<i>Agaricus campestris</i>)	未 测	
蒙古锦鸡儿 (<i>Caragana arborescens</i>)	+	-
伴刀豆球蛋白 (<i>Concanavalina ensiformis</i> , jack bean) ConA	+	-
大豆 (<i>Glycin max</i> , soybean) SBA	+	-
香豌豆 (<i>Lathyrus odoratus</i>) LATH	+	+
扁豆 (<i>Lens culinaris</i> , lentil) LCA	+	-
利马豆 (<i>Phaseolus limatus</i> , limabean) PLA	-	+
菜豆 (<i>Phaseolus vulgaris</i> , red kidney bean) PHA	+	-
蜡豆 (<i>Phaseolus vulgaris</i> , waxbean) PWA	+	-
美洲商陆 (<i>Phytoloca americana</i> , pokeweed) PWM	+	+
豌豆 (<i>Pisum sativum</i> , garden pea) PSL	+	-
刺槐 (<i>Robinia pseudoacacia</i>)	+	+
槐II (<i>Sophora japonica</i>)	-	+
荆豆 _I (<i>Ulex europeus</i>) UEA _I	+	+
蚕豆 (<i>Vicia faba</i> , broad bean)		
多花紫藤 (<i>Wistaria floribunda</i> var. <i>macrobotrys</i>)		
WFM	+	-

均无分裂作用,不论是神经氨酸酶处理的或未处理的淋巴细胞均不被其激活,而四价或多价的 SBA (在储存过程中自身聚合或用戊二醛交联) 使猪淋巴细胞和神经氨酸酶处理的小鼠、大鼠和人的淋巴细胞分裂^[23]。其他凝集素如 PNA、PLA 等也有相似作用,四价的 PLA (分子量 247,000) 是强的促分裂原而二价的 PLA (分子量 124,000) 即使有促分裂活力也极弱^[24]。提示某些没有促分裂作用的凝集素在聚合后可能变成具有促细胞分裂的作用。这一现象也说明激活作用需要凝集素与细胞表面受体的多点接触。(5) 凝集素的浓度。各凝集素促细胞分裂所需的浓度不同,均有各自的最适浓度,高于最适浓度活力反而下降。当浓度超过 100 μ g/ml 绝大多数凝集素不再显示促细胞分裂活力。

4. 免疫作用

Ehrlich 借蓖麻素和相思豆素确立了免疫学的某些最基本的原理,包括免疫反应的专一性和抗体-抗原相互作用的可逆性。他给小鼠多次皮下注射小剂量蓖麻素后,小鼠对致死剂量的蓖麻素获得免疫力。并证明免疫的小鼠血清能中和蓖麻素的毒性,抗相思豆素的抗血清不能中和蓖麻素的毒性;同样抗蓖麻素的抗血清也不能中和相思豆素的毒性。中和反应极专一。由此证明免疫专一性与抗血清有关。另外又证明怀孕动物获得的免疫力可由母体传给予子代。

凝集素的免疫作用相当复杂,它能激活免疫系统,但在不同的条件下,它又有抑制作用。凝集素激活淋巴细胞的反应与抗原诱导的免疫反应相似,被激活的 B 细胞合成免疫球蛋白, T 细胞转变为“T-杀伤细胞”。

激活的淋巴细胞显示某些细胞特有的反应。淋巴细胞一旦被激活,立即释放出多种具有生物活力的物质,总称淋巴细胞激活素 (lymphokines)。至少其中的若干种在细胞免疫反应中起作用。它们确切的化学性质、它们间的相互关系以及它们的意义和作用机理

尚不了解,其中略为了解的有干扰素、淋巴毒、移动抑制因子(MIF)和巨噬细胞凝聚因子(MAF)。在免疫学研究中它们是有实用价值也是令人感兴趣的一个课题。被凝集素激活的淋巴细胞同样显示这种反应,因此在这一课题的研究中凝集素将有光辉的前途。

凝集素的显著免疫抑制作用表现于抑制各种动物对同种异体器官或组织移植的排斥和抑制迟缓过敏反应。在异体皮肤移植前先给小鼠 PHA 或 ConA,可明显地延长皮肤存活时间^[25,26]。若移植前先给 PHA,移植后再给抗淋巴细胞免疫球蛋白,则皮肤存活时间更长^[27]。离体给药也有同样效果,用含 PHA 或 ConA 的灌注液离体处理狗肾,将处理后的狗肾移植至异体,存活时间最长的可达 60 天,平均 39.8 ± 4.3 天,未经处理的肾移植至异体,一般存活时间不超过 16 天。凝集素的浓度和灌注液的温度均会影响处理效果^[28]。提示 PHA 或 ConA 结合于细胞表面可干扰宿主对移植抗原的识别和清除。PHA 和 ConA 也抑制细胞介导的延迟过敏反应,给豚鼠或大鼠腹腔注射 ConA 或 PHA 显著地抑制其对某些外源物质的延迟过敏反应。如同时注射 PHA 和 D-GalNAc 或 D-Gal,部份阻断 PHA 的免疫抑制作用^[29]。提示抑制作用包含 PHA 与细胞膜上互补糖链的结合。

凝集素亦抑制吞噬作用。多形核白细胞的主要功能是吞噬作用,这种作用可能包含了被吞噬的颗粒吸附于白细胞的专一位点。ConA 凝集成熟的多形核白细胞,抑制其吞噬作用。另一种解释则谓 ConA 抑制膜的内陷。与 ConA 互补的糖有去抑制作用^[30]。提示抑制可能是由于 ConA 阻止颗粒吸附于细胞表面专一的吞噬位点。

凝集素具有的多种生物效应,使它们在细胞生物学的多方面进展中起重要作用,并成为生物科学研究中极其有用的工具。因此近十数年来凝集素应用于生物科学的研究已取得惊人的进展,下面介绍应用于免疫学研究中的若干主要方面。

二、凝集素在免疫学中的应用

1. 分离纯化糖蛋白(包括抗原)

凝集素识别一定顺序的糖链并与之专一地结合的能力,提供了分离纯化包含不同寡糖结构的糖蛋白和糖脂的新方法。

甲种胎儿蛋白(简称 AFP)是一类含有中性糖(甘露糖和半乳糖)和乙酰神经氨酸的不均一抗原蛋白。用免疫吸附亲和和层析法纯化的大鼠胚胎血清 AFP 或人肝癌患者血清 AFP,在聚丙烯酰胺凝胶电泳上出现不止一个组分。凝集素-琼脂糖珠柱可将免疫吸附亲和和层析柱不能分开的组分分离,固定化于琼脂糖珠的蓖麻凝集素(简称 RCA₁,分子量 120,000)可将免疫吸附亲和和层析柱纯化而仍不均一的 AFP 分成两部分,与 RCA₁ 结合的 AFP (AFP_{A₁})占 8~10%,不结合的 AFP (AFP_{A₂})占 90~92%,它们的差别主要是 N-乙酰神经氨酸含量不同,AFP_{A₁} 每个分子有六个 N-乙酰神经氨酸基,而 AFP_{A₂} 只有四个。AFP_{A₁} 由神经氨酸酶处理后,能和 RCA₁ 结合^[31],表明除去糖链末端神经氨酸使半乳糖基暴露,因而能和 RCA₁ 结合。ConA-琼脂糖珠柱可将人肝癌患者血清 AFP、孕妇羊水 AFP 和大鼠胚胎血清 AFP 分成与 ConA 结合和不结合的两部份^[32]。胎儿血清 AFP 与 ConA 不结合的成分比羊水的低得多,当胎儿血清漏入羊水时羊水中不与 ConA 结合的 AFP 成分明显下降,因此可测羊水中不与 ConA 结合的 AFP 来诊断畸形胎儿,

初步结果指出此法有临床诊断价值^[33]。顺次使用聚丙烯酰胺凝胶电泳、RCA₁-琼脂糖珠柱和 ConA-琼脂糖珠柱分离大鼠胚胎血清 AFP, 可得九种不同的变种^[34]。

使用免疫吸附亲和层析纯化的乙型肝炎表面抗原(简称 HBsAg) 往往有血清蛋白污染。neurath 等曾用 ConA-琼脂糖珠柱分离 HBsAg, 但所得产物仍含有血清蛋白。近年发现从延命菊(*maryuerite*) 叶子提取的一种凝集素与 HBsAg 有专一亲和性, 这种凝集素经人血红蛋白、血清白蛋白、 γ -球蛋白或人 AB 型红血球吸收, 凝集素的活力不减^[35]。是一种有希望作为纯化 HBsAg 的有效凝集素。另外, 用 ConA-琼脂糖珠柱分离纯化 HBsAg 的多肽亚基, 操作简便, 并可大量制备。HBsAg 经 TritonX-100 破碎, 在 ConA-琼脂糖珠柱上可分成结合的和结合不结合的两部分。不结合部分是分子量为 64,000 的单一多肽, 血清学性质与血清白蛋白相同, 与抗 HBsAg 不亲和。与 ConA 结合的部分含有二个多肽成分, 分子量为 28,000 和 23,000, 具有 HBsAg 活力^[36]。

用凝集素分离纯化糖蛋白的例子还很多, 如用固定化的 PHA 亲和层析柱分离干扰素^[37]。草蓼凝集素-琼脂糖珠柱可将卵巢囊液的 A 血型物质分成化学成分和血清学活性不同的四个组分^[38]。用 ConA-琼脂糖珠柱分离免疫球蛋白, 可得到不污染有其他免疫球蛋白的 IgG^[39,40]。近年利用固定化凝集素分离纯化各种糖蛋白的工作发展极快, 举不胜举, 这里仅是几个例子。

利用凝集素不仅可鉴别抗原的细微差异, 更好地分离纯化不同种的抗原, 并可把这些结果应用于工业生产和临床诊断。

2. 血型鉴定

某些凝集素的血型专一性非常强, 不但能十分准确地区别 A、B、O 型, 且能区别不同的亚型, 因此凝集素是鉴别血型的一种良好工具。对于 O 型血球的鉴定, 由于没有天然的抗 O 抗体, 凝集素有其独特的作用, 如欧洲百脉根凝集素、荆豆凝集素都是鉴定 O 型血球的良好试剂。双花藜豆凝集素国外已在血库中广泛使用, 是鉴别 A₁ 亚型最简单和最快速的试剂。Vicia graminia 凝集素和屈曲花(亦称蜂宝花)凝集素可鉴定 N 亚型和 M 亚型。Bandeiraea simplicifolia 凝集素虽是较强的抗-B试剂, 但有相似强度的抗-AB 活力。食用小皮伞(Marasmius oreades) 虽是一种良好的抗 B 试剂, 但效价太低, 因此都不能用于 B 型红细胞的鉴定。最近发现木蹄真孔菌(Fomes fomentarius) 凝集素能凝集 B 型红细胞, 也许有可能作为抗 B 试剂。另外凝集素还可用于“异分泌者(secretors)”(注 2) 的诊断和分型, 其结果可靠^[6]。

3. 分离和纯化淋巴细胞

各种淋巴细胞表面有凝集素受体, 不同的细胞其表面受体不一样, 因此可借凝集素分离不同的淋巴细胞(T 细胞和 B 细胞)和它们的亚群。分离方法主要有三种: (1) 利用溶解的凝集素对细胞的选择性凝聚, 将凝聚的和凝聚的细胞分开, 然后用适当的“半抗原”糖将凝聚的细胞解离; (2) 将细胞专一地吸附于固定化的凝集素, 然后用适当的方法将细胞分开; (3) 用荧光标记的凝集素与细胞作用, 然后经荧光激活细胞分类器将结合荧光标记凝集素的不结合和结合的细胞分开。目前较为普遍地应用的凝集素有若干种如 SBA、PNA 等(表 3)。

表 3 用于分离细胞的凝集素

凝 集 素	缩 写	糖 专 一 性
伴刀豆球蛋白	ConA	D-Man., D-Glc.
扁豆	LCA	D-Man., D-Glc.
蜗牛	HP	D-GalNAc
龙虾 (<i>Homarus americanus</i>)	HA	D-葡萄糖胺
鲎 (<i>Limulus polyphemus</i>)	LP	NANA»D-GalNAc, 葡萄糖醛
花生	PNA	D-Gal β (1→3)-D-GalNAc»D-Gal.
大豆	SBA	D-GalNAc>D-Gal.
长柔毛野豌豆 (<i>Vicia villosa</i>)	VVL	D-GalNAc
槐 II		D-Gal.
麦胚	WGA	D-GlcNAc

(1) 红细胞与淋巴细胞的分离纯化 早在本世纪四十年代末就有人利用 PHA 分离红细胞和白细胞,红细胞被能凝集红细胞的 PHA (E-PHA) 凝集,从红细胞与白细胞的混合液中除去,但不能回收。后来在方法上作了改进,用吸有 ConA 的尼龙纤维分离小鼠的红细胞和胸腺细胞获得成功。将吸有低浓度 ConA 的尼龙纤维浸入细胞混合液,只有胸腺细胞与这样处理的尼龙纤维结合,用介质洗去未结合的红细胞后,用针将结合在纤维上的细胞拨下,可定量回收红细胞和胸腺细胞^[41]。

(2) T 细胞和 B 细胞的分离纯化 用于分离 T 细胞和 B 细胞的凝集素已有多(表 4),并且不断有新的凝集素被发现,目前用得最多的是 SBA。利用 T 细胞和 B 细胞与 SBA 结合的差异,在小鼠脾细胞中加入 SBA, B 细胞被 SBA 凝集, T 细胞不被凝集,凝集的和 not 凝集的细胞很容易用离心方法分开,在凝集的细胞中加入半乳糖,分离出单个的 B 细胞,就可得到纯的 T 细胞和 B 细胞^[42]。也可用荧光标记的 SBA (FITC-SBA) 与小鼠脾细胞作用,然后经荧光激活细胞分类器 (FACS) 将结合 FITC-SBA 的 B 细胞和不结合的 T 细胞分离。其他凝集素如 WGA 也可分离小鼠淋巴细胞的 T 细胞和 B 细胞, B 细胞被 WGA 凝集,离心,将分散的单个 T 细胞与凝集的 B 细胞分离,凝集的 B 细胞用 GlcNAc 分解为单个细胞,但 WGA 的分离效果不如 SBA,大约有 10~15% 的交叉污染^[43]。蜗牛 (*Helix pomatia*) 凝集素(简称 HP)可分离由神经氨酸酶处理的人血淋巴细胞。人血淋巴细胞上 HP 受体(主要在 T 淋巴细胞上)糖链上的神经氨酸基经酶处理

表 4 T 细胞和 B 细胞的分离及纯化

细 胞	凝 集 素	分离方法*	细胞特性**	
			L ⁺	L ⁻
鼠脾细胞	SBA, WGA	SA	B	T
鼠脾细胞	SBA, PNA	SA	干细胞	
鼠脾细胞 (经神经氨酸酶处理)	HP	AC	T	B
鼠骨髓细胞	SBA, PNA	SA	干细胞	
鼠骨髓细胞	WGA	AC	干细胞	
人外周血淋巴细胞 (经神经氨酸酶处理)	HP	AC	T	B

注: * SA = 选择凝集法; AC = 亲和层析法

** L⁺, 与凝集素结合; L⁻, 与凝集素不结合。

除去后,受体就可与 HP 结合。借 T 细胞与 B 细胞表面受体的差异,利用 HP 将它们分离,人淋巴细胞悬液流经 HP-琼脂糖珠柱,B 细胞不与 HP 结合,可从流出液中回收,结合于柱上的 T 细胞用 GalNAc 溶液洗脱^[44]。

(3) 淋巴细胞亚群的分离纯化 利用某些 T 细胞被凝集素凝聚,某些不被凝聚的性质,可分离纯化多种 T 细胞亚群(表 5)。将小鼠胸腺细胞与 PNA (0.25ml, 1mg/ml)温

表 5 细胞亚群的分离纯化

细 胞	凝 集 素	分离方法*	细胞特性**	
			L+	L-
鼠胸腺细胞	PNA	SA, AC	未成熟细胞	成熟细胞
鼠胸腺细胞	HA	FACS	成熟细胞	未成熟细胞
鼠胸腺	PNA	FACS		CTLp†
鼠外周血淋巴细胞	PNA	FACS	抑制细胞	
鼠脾 T 细胞	VVL	AC	CTL	
鼠 T 细胞	LP	FACS	辅助细胞	
鼠胚胎癌细胞	PNA	SA	未分化细胞	分化细胞
人胸腺细胞	PNA	SA	未成熟细胞	成熟细胞
脐带血	PNA	SA	未成熟细胞	成熟细胞
人外周血 T 细胞	WGA	AC		

注: †CTLp = CTL 前身细胞。其余说明见表 4 注

育、离心,分开凝集的和未凝集的细胞,凝集的细胞在 D-Gal 溶液中温育,使细胞与凝集素解离(图 1)^[45]。大量未成熟的细胞被凝集,成熟的细胞不被凝集。分得的两种细胞含活细胞均在 95% 以上,得率均在 80% 以上,与 PNA 结合的细胞(简称 PNA⁺),其表面标记、对促细胞分裂原的反应、生化性质、免疫活性等基本上与免疫学上未成熟的细胞相同,而不被凝集的细胞(简称 PNA⁻)其性质与抗氢化可的松的成熟细胞相似^[46]。用荧光标记的 PNA 借 FACS 可将 ConA 激活的鼠 T 细胞分为 PNA⁺ 和 PNA⁻ 两种细胞, PNA⁺ 细胞在免疫系统中具有抑制作用,属于“抑制 T 细胞”。用同样方法,荧光标记的凝集素(简称 LP)可分离 LCA 激活的鼠 T 细胞,与 LP 结合的细胞在免疫系统中具有“辅助 T 细胞”的作用^[47]。用荧光标记的 PNA 亦成功地分离和纯化了人胸腺细胞的成熟亚群和未成熟亚群^[48]。固定化的 WGA 可将人体外周血的 T 细胞分为对具有促细胞分裂作用的凝集素敏感和不敏感的两类^[44]。也可将不同类型的小鼠骨髓细胞分开^[45]。HP 可将神经氨酸酶处理的小鼠脾细胞分为自然杀伤细胞(简称 NK)和产生细胞毒的 T 细胞(简称 CTL),由于 NK 细胞和 CTL 与 HP 的结合强度不同,可用不同浓度的 GalNAc 溶液将它们从 HP-琼脂糖珠柱上分别洗脱, GalNAc 溶液浓度比洗脱 CTL 的溶液浓度低 10 倍时, NK 细胞被洗脱,而 CTL 仍结合在柱上,借此两者得到分离^[49]。

随着凝集素的纯化及性质鉴定工作的迅速发展和为深入研究各类淋巴细胞的功能及其相互关系的需要,必将有更多种类的凝集素用于细胞的分离纯化。在方法上也会有所发展。近年从长柔毛野豌豆种子提取的凝集素(简称 VVL)与鼠类的 CTL 专一作用,可利用此特性分离 CTL 细胞。将细胞悬液通过 VVL-Biogel (VVL 交联于 Biogel) 柱, CTL 吸附于柱上,用 D-GalNAc 洗脱,得到较纯的 CTL^[50]。在分离方法上除上述三种外,近年有人利用形成玫瑰花结分离 B 细胞和 T 细胞或它们的亚类。鼠脾细胞或胸腺细胞与 PNA 和被神经氨酸酶处理的羊红细胞温育,低浓度 PNA (2.5μg/ml) 时,形成玫瑰

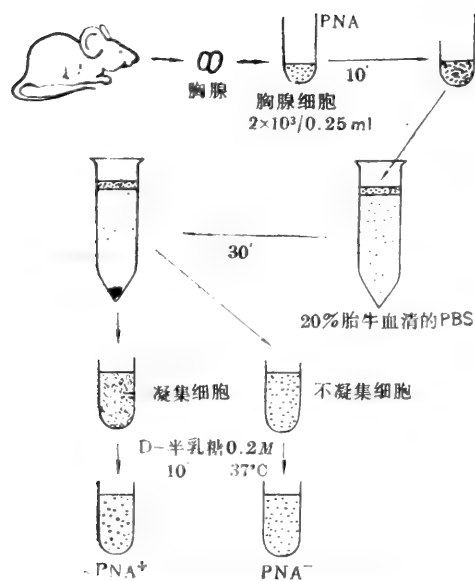


图1 花生凝集素分离鼠胸腺细胞

花结的细胞主要是无免疫力的T细胞，Ficoll 梯度离心，将形成玫瑰花结的细胞与游离细胞分开^[51]。也有人用相应的抗凝集素抗体免疫吸附亲和和层析柱分离不同类型的细胞。如抗 PNA 抗体柱分离 PNA⁺ 和 PNA⁻^[52]。

4. 用于探索免疫反应机理

被凝集素在体外激活的淋巴细胞发生的形态和生化变化，与抗原诱导的发生在体内的多种免疫反应相似，因此凝集素在免疫学机理研究中是一名得力的助手。利用凝集素研究刺激淋巴细胞分裂的机理，目前已观察到一些线索。凝集素与淋巴细胞一起培养，首先是细胞表面与凝集素结合，结合后最初引起的细胞膜结构的改变可能与激活的起始直接有关。电子顺磁共振（EPR）测定证明，用促使细胞分裂浓度的 PHA 处理人血淋巴细胞和促使细胞分裂浓度的 ConA 处理小鼠脾淋巴细胞使细胞膜的脂质分子产生流动，在处理 15~30 分钟时流动最大，流动程度与剂量的相应曲线和凝集素促细胞分裂作用的能力与凝集素剂量的相应曲线一致^[53]。没有促细胞分裂效应的凝集素如 WGA、多花紫藤凝集素（简称 WHF）均不导致细胞膜上分子流动性的改变，提示细胞膜上分子流动性的改变直接关系到细胞膜的激活。破坏胞浆内微管结构的秋水仙碱、长春花碱等药物亦抑制 ConA 诱导的细胞分裂。加入过量的秋水仙碱对 S 期的细胞没有影响，表明其抑制 [³H]-胸腺嘧啶核苷的参入不是由于阻断胸腺嘧啶核苷的运转或抑制 DNA 合成。亦不能证明秋水仙碱的抑制作用是由于导致存活细胞数的减少或使激活细胞的分裂停止在间期。再则，动力学数据表明秋水仙碱阻断凝集数的激活在凝集素作用的早期，提示淋巴细胞的被激活与胞浆内微管结构的改变密切相关^[54,55]。另外，淋巴细胞的激活可能需要细胞与细胞的协作，分离的单个淋巴细胞在琼脂糖悬液中培养，对促分裂原的反应极差^[56]。

在生化变化方面，认为与淋巴细胞被激活的起始直接有关的是细胞膜上分子侧向移动形成小槽，使 K⁺ 和 Ca⁺⁺ 向细胞内流的速度增加，人淋巴细胞经 PHA 处理，约 1 小

时观察到 K^+ 和 Ca^{++} 向内流的速度提高 2~3 倍, 而外流速度没有改变^[57]。也有人认为细胞内 cAMP 和 cGMP 量的改变与细胞的激活有关。人周围血淋巴细胞与 ConA 或 PHA 作用, 细胞内的 cGMP 浓度急剧增加, 最初的 30 分钟增加 10~15 倍, 约 1 小时后回复到原来水平, 提示 cGMP 的短暂性增加可能与细胞分裂有关, 但目前对此论点尚有争论^[19,57]。

凝集素的应用范围很广, 远不止文中所提的, 如用于临床诊断先天性和获得性的免疫缺陷; 检验由感染或某些自身免疫导致的过敏; 对各种免疫抑制和免疫治疗效应的监测; 病毒的分离纯化; 细胞变异的研究以及染色体的细胞遗传研究等等。

凝集素广泛存在于生物体, 对产生它的机体有何生物学作用? 葫芦科植物如南瓜、黄瓜、甜瓜、西瓜等韧皮部的凝集素具有相同的糖专一性; 谷类植物种子的胚如麦胚、米胚的凝集素亦有相同的糖结合专一性, 它们都能和真菌或细菌细胞壁的甲壳双糖结合, 它们的作用可能是保护植物或种子抵抗病菌或植物病原体的侵蚀。豆科植物根部特别是须根部分分泌的凝集素可与根瘤菌结合, 可能在植物形成根瘤过程中起重要作用。某些种子在发芽后种子内的凝集素即消失, 如蓖麻子发芽后数天内即失去其所含的凝集素, 种子中的凝集素可能为胚芽的生长提供养料, 也可能在种子发芽时起代谢调节作用。哺乳动物肝细胞表面的凝集素具有相同的糖专一性, 如兔肝和人肝细胞表面的凝集素都与末端为半乳糖的糖蛋白结合, 它们都能清除循环血液中的去唾液酸糖蛋白。虽然凝集素的应用日益广泛, 但人们对凝集素在产生它的机体内的作用知道得还很少。这一广阔的领域正有待我们去发掘。

注 1: lectin 从拉丁文 legere 来, 意为选择, 原译为外源凝集素。agglutinin 译为凝集素, 国外文献中 lectin 和 agglutinin 两字的使用区别不大, 如 wheat germ agglutinin 和 wheat germ lectin 都用, 并无规定。根据近年研究的进展, 在禽类、哺乳动物的多种细胞中都有 lectin, 它们具有凝集机体内某些非同源细胞的能力, 因此外源凝集素这一译名似乎就欠妥了。建议译为异源凝集素或凝集素。

注 2: 异分泌者是指某类患者, 分泌有血型专一性的糖蛋白到唾液、尿及其他体液中。

参 考 文 献

- [1] Boyd, W. C., The Proteins, 1954, 2, 755, Neurath, H. & Balley, K. (eds), N. Y. Academic.
- [2] Hammarström, S. et al., *Biochemistry*, 1977, 16, 2750.
- [3] Lotan, R. et al., *J. Biol. Chem.*, 1975, 250, 8518.
- [4] Goldstein, I. J., *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1974, 55, 35, Chowdhury, T. K. & Weiss, A. K. (eds.), Plenum Press.
- [5] Golbraith, W. & Goldstein, I. J., *FEBS Lett.*, 1970, 9, 197.
- [6] Sharon, N., *Scientific Amer.*, 1977, 236(6), 108.
- [7] Gunther, G. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 1973, 70, 1012.
- [8] Lotan, R. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1973, 55, 1347.
- [9] Tunis, M. et al., *Protides Biol. Fluids*, 1980, 27, 521, Peeter, Dr. H. (ed.), Pergamon Press.
- [10] Gorden, J. A. & Marquardt, M. D., *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1974, 55, 335, Chowdhury, T. K. & Weiss, A. K. (eds.), Plenum Press.
- [11] Lis, H. & Sharon, N., *Ann. Rev. Biochem.*, 1973, 42, 541.
- [12] Boyd, W. C., *Vox Sang.*, 1963, 8, 1.
- [13] Hayes, C. E. & Goldstein, I. J., *J. Biol. Chem.*, 1974, 249, 1904.
- [14] Prigent, M. J. & Bourrillon, R., *Glycoconjugates*, Proc. 5th International Symposium, 1979, 157, Schauer, R. et al. (eds.).
- [15] Sharon, N. & Lis, H., *Science*, 1972, 177, 949.
- [16] Shier, W. T., *Drug Carriers in Biology and Medicine*, 1979, 43, Gregoriadis, G. (ed.), Academic Press.

- [17] Watkins, Dr. W. M. & Morgen, W. T. J., *Nature*, 1952, **169**, 825.
- [18] Nowell, P. C., *Cancer Res.*, 1960, **20**, 462.
- [19] Lis, H. & Sharon, N., *The Antigens*, 1977, IV, 429, Michael, S. (ed.), Academic Press.
- [20] Stobo, J. D. et al., *J. Immunol.*, 1972, **108**, 1.
- [21] Novogrodsky, A. et al., *J. Immunol.*, 1975, **115**, 1243.
- [22] Novogrodsky, A. & Katchalski, E., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 1973, **70**, 2515.
- [23] Schechter, B. et al., *Eur. J. Immunol.*, 1976, **6**, 145.
- [24] Bessler, W. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1976, **69**, 578.
- [25] St. Pierre, R. I., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1967, **126**, 687.
- [26] Markowitz, H. et al., *Science*, 1969, **163**, 476.
- [27] Moore, C. D. & Slavin, R. G., *Transplantation*, 1971, **11**, 563.
- [28] Lis, H. et al., *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1974, 55, 309, Chowdhury, T. K. & Weiss, A. K. (eds.), Plenum Press.
- [29] Markley, K. et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1972, **139**, 37.
- [30] Berlin, R. D., *Nature (New Biol.)*, 1972, **235**, 44.
- [31] Bayard, B. et al., *FEBS Lett.*, 1977, **80**, 35.
- [32] Smith, C. J. & Kelleher, P. C., *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, **317**, 231.
- [33] Kelleher, C. J. et al., *Protides Biol. Fluids*, 1980, **27**, 649, Peeter, Dr. H. (ed.), Pergamon Press.
- [34] Bayard, B. & Kerchaert, J. P., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1977, **77**, 489.
- [35] Ikemoto, S. et al., *Vox Sang.*, 1978, **34**, 22.
- [36] Skelly, J. et al., *J. Gen. Virol.*, 1979, **44**, 679.
- [37] Dorner, F. et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 1973, **70**, 1981.
- [38] Kristiansen, T., *Biochim. Biophys. Acta*, 1974, **338**, 246.
- [39] Welustein, Y. et al., *J. Immunol.*, 1972, **109**, 1402.
- [40] Løwenstein, H. et al., *Protides Biol. Fluids*, 1980, **27**, 611, Peeter, Dr. H. (ed.), Pergamon Press.
- [41] Edelman, G. M. & Rutishauser, U., *Meth. Enzymol.*, 1974, **34**, 195, Jakoby, W. B. & Wilchek, M. (eds.), Academic Press.
- [42] Reisner, Y. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1976, **72**, 1585.
- [43] Bourginon, L. Y. W. et al., *J. Cell Physiol.*, 1979, **99**, 75.
- [44] Hammarström, S. et al., *Affinity Chromatography*, 1978, 273, Hoffman-Ostenhof et al. (eds.), Pergamon Press.
- [45] Reisner, Y. & Sharon, N., *Trends Biochem. Sci.*, 1980, **5**, 29.
- [46] Reisner, Y. et al., *Cell Immunol.*, 1976, **25**, 129.
- [47] Nakano, T. et al., *Glycoconjugates*, *Proc. 5th International Symposium*, 1979, 452, Schauer, R. et al. (eds.).
- [48] Reisner, Y. et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 1979, **76**, 447.
- [49] Haller, O. et al., *Eur. J. Immunol.*, 1978, **8**, 765.
- [50] Kimura, A., *J. Exp. Med.*, 1979, **149**, 473.
- [51] Berrih, S. et al., *Protides Biol. Fluids*, 1980, **27**, 551, Peeter, Dr. H. (ed.), Pergamon Press.
- [52] Irlé, C., *J. Exp. Med.*, 1978, **148**, 22.
- [53] Barnett, R. E. et al., *Nature*, 1974, **249**, 465.
- [54] Edelman, G. M. et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 1973, **70**, 1442.
- [55] Wang, J. L. et al., *J. Cell Biol.*, 1975, **66**, 128.
- [56] Kondracki, E. & Milgrom, F., *Fed. Proc.*, 1976, **35**, 511.
- [57] Brown, J. C. & Hunt, R. C., *Intern. Rev. Cytology*, 1978, **52**, 277.

免疫活性细胞的表面标志*

邵国英 朱炳法

(上海第二医学院、上海市免疫学研究所)

一、存在于T淋巴细胞表面的表面标志

1. 胸腺白血病抗原 (TL)
2. T淋巴细胞的淋巴细胞表现型抗原系统 (Ly 抗原)
3. 胸腺细胞抗原-1 (Thy-1)
4. Gross 病毒抗原 (GIX 抗原)
5. 小鼠特异淋巴细胞抗原 (MSLA)
6. T细胞的脑相关抗原
7. 绵羊红细胞受体
8. T细胞表面的激素受体
9. T细胞的蜗牛血凝素及花生凝集素受体
10. T细胞表面的病毒受体

二、存在于B淋巴细胞的表面标志

1. B淋巴细胞的淋巴细胞表现型抗原系统 (Ly-4, Ly-7)

2. 小鼠B淋巴细胞抗原 (MBLA)
3. 小鼠特异浆细胞抗原 (MSPCA)
4. 人B淋巴细胞的新标志
5. 浆细胞抗原
6. 浆细胞-肝-肾-脑抗原 (P、L、K、B)
7. 补体受体 (CR)
8. EB 病毒受体
9. B细胞的表面膜免疫球蛋白 (SmIg)

三、存在于T、B淋巴细胞表面的共同标志

1. 组织相容性抗原
2. I 区相关抗原 (Ia 抗原)
3. Ly-8 抗原
4. 胸腺-B 细胞共同抗原 (Th-B)
5. Fc 受体
6. T、B 淋巴细胞表面的有丝分裂原受体

近二十年来,免疫活性细胞表面标志的研究已成为一个十分活跃的领域,并且已经取得了相当的进展。现在免疫学者不仅能从淋巴细胞的表面标志区分 T、B 淋巴细胞及其亚群,而且还发现了新的免疫活性细胞,如K细胞、NK 细胞及D细胞。近年来人们利用各类淋巴细胞表面标志的不同或性质上的差别,有可能从不均一的淋巴细胞群中分离出单一的淋巴细胞株,这为研究各类淋巴细胞在免疫反应中的作用及各类淋巴细胞间的相互作用提供了前提,从而推动免疫反应机理的深入研究。由于淋巴细胞分化成熟过程中伴随着表面标志的变化,这不仅有利于研究淋巴细胞分化成熟的规律,而且为研究调节淋巴细胞分化成熟的因子如胸腺激素的作用机理及表面标志与基因调控之间的关系提供了条件。总之,免疫活性细胞表面标志的研究已渗透到免疫学、细胞生物学、分子生物学和临床医学的各个领域并起着积极的推动作用。

淋巴细胞的表面标志基本上有两大类,一类是表面抗原,另一类是表面受体。研究这两类标志有两种基本的方法,一种是利用特异的抗血清(包括天然的、同种的或异种的抗血清抗体,近年来又发展用杂交瘤产生的单株抗体)来测定表面特异抗原;另一种是利用淋巴细胞表面存在的各种特异受体能与相应的物质如免疫球蛋白、补体、红细胞、病毒和激素相结合。现有淋巴细胞表面标志的许多知识大多来源于小鼠淋巴细胞的研究,这是因为小鼠的纯系及杂交品系容易人为控制,而且人们认为从小鼠淋巴细胞表面测出的各

* 本文承余贺教授、陆德源教授、言穆琳和臧人杰同志审阅,特此致谢。

种表面抗原和受体也见于大多数动物(包括人类)的淋巴细胞^[1]。尽管个别的表面标志尚有争论,但在确定某种淋巴细胞的时候,往往要用“几种”表面标志,故并不因个别标志有争论而影响这一淋巴细胞的确定。本文着重讨论三方面的问题:

- (1) 存在于T淋巴细胞表面的表面标志;
- (2) 存在于B淋巴细胞表面的表面标志;
- (3) 存在于T和B淋巴细胞表面的共同标志。

一、存在于T淋巴细胞表面的表面标志

T淋巴细胞表面存在的特异表面抗原有同种异体抗原和异种表面抗原两大类,而T淋巴细胞表面存在的特异受体也有多种,现分别讨论如下:

1. 胸腺白血病抗原 (TL)

Boyse 等^[2] 早期的工作已经说明 TL 抗原是由四种不同的抗原即 TLal, TLa2, TLa3 和 TLa4 组成的复合物。其位点在小鼠的第十七对染色体近 H-2 复合物的D末端,并把它命名为 TLa 位点。用胸腺细胞带 TL 抗原的小鼠作近亲交配,观察其子代 TLa 单型的分布,发现子代小鼠呈现三种单型,它们是 TLa^a、TLa^b 和 TLa^c。这三种单型在胸腺细胞和白血病细胞上呈现的 TLa 表型如表 1 所示。

表 1 几种小鼠 TLa 的单型与表型

小鼠品系	单 型	胸腺细胞 TLa 表型	白血病细胞 TLa 表型
A	TLa ^a	1, 2, 3, —	1, 2, 3, —
C57BL/6	TLa ^b	—, —, —, —	1, 2, —, 4,
BALA/c	TLa ^c	—, 2, —, —,	1, 2, —, —,
DBA/c	TLa ^c	—, 2, —, —,	1, 2, —, 4,

上表说明(1)不同 TLa 单型小鼠的胸腺细胞所带的 TLa 抗原各不相同;(2)除 TLa^a 单型小鼠的胸腺细胞和白血病细胞有相同的 TLa 表型外,其余的二种单型小鼠中其胸腺细胞与白血病细胞上 TLa 表型均不相同,因此只测白血病细胞的 TLa 表型并不能确定胸腺细胞的 TLa 表型。(3)因为白血病细胞上的 TLa4 不存在于胸腺细胞,故 Boyse 等认为它是真正的白血病抗原。

T细胞在成熟分化的过程中 TL 抗原存在着时相的变化。即早期的干细胞缺乏TL 抗原,但在胸腺内发育时出现 TL 抗原,而当T细胞成熟离开胸腺进入周围淋巴器官时, TL 抗原再次消失。因此可以把 TL 抗原看成为与T细胞分化相关的表面标志,而且已有实际的应用,例如许多实验室已经提示胸腺激素如胸腺素、胸腺生成素、胸腺因子能诱导前T细胞表达 TL 抗原,故认为这些胸腺激素是T细胞分化成熟所必需的^[3-5]。Storrie 等进一步从小鼠的脾和骨髓中分离前T细胞,在体外与胸腺生成素保温二个半小时,用抗 TL 血清作细胞毒分析证实,保温后的前T细胞已表达 TL 抗原,在此基础上,他们进一步用阿拉伯胞苷、放线菌素-D 和嘌呤霉素等抗代谢物研究胸腺生成素诱导前T细胞产生 TL 抗原的作用环节,已经证明胸腺生成素的诱导作用要通过 DNA 的转录和 RNA

的翻译,但不需要 DNA 的复制^[6]。从 TL 的表达与 T 细胞分化相关的时相变化以及胸腺细胞成熟过程中 TL 抗原与 H-2 抗原含量之间呈现反比关系,人们推测 TL 抗原的表达可能受到调节基因的控制^[7],但可惜这种调节基因至今尚未证实。生化研究的资料说明 TL 抗原和 H-2 抗原两者有相同的分子量(40,000~50,000)^[8]。用 ³H-氨基酸和 ¹⁴C-岩藻糖作双标记研究 TL 抗原和 H-2 抗原,也已经证明这两种抗原均为糖蛋白^[9]。Ostberg^[10] 和 Vitetta^[11] 等已证明,TL 抗原和 H-2 抗原中均存在 β_2 微球蛋白,且两者结合的 β_2 微球蛋白是均一的。

2. T 淋巴细胞的淋巴细胞表现型抗原系统 (Ly 抗原)

属 T 淋巴细胞的 Ly 抗原已知的有五种,它们的位点大部分已经确定,现将它们的位点、等位基因及抗原特异性列于表 2:

表 2 T 淋巴细胞 Ly 位点、等位基因和抗原特异性

位点名称	染色体	等位基因	抗原特异性
Ly-1 (Ly-A)*	19	Ly-1 ^a	Ly-1.1 (Ly-A.1)
		Ly-1 ^b	Ly-1.2 (Ly-A.2)
Ly-2 (Ly-b)**	6	Ly-2 ^a	Ly-2.1 (Ly-B.1)
		Ly-2 ^b	Ly-2.2 (Ly-B.2)
Ly-3 (Ly-c)**	6	Ly-3 ^a	Ly-3.1 (Ly-C.1)
		Ly-3 ^b	Ly-3.2 (Ly-C.2)
Ly-5	未定	Ly-5 ^a	Ly-5.1
		Ly-5 ^b	Ly-5.2
Ly-6	未定	未定	Ly-6.2

* 括号内为旧称 ** 可能为一个位点

T 淋巴细胞的 Ly 抗原之所以受到重视,因为它们是小鼠 T 淋巴细胞功能亚群的分类基础。Cantor 和 Boyse^[12] 以及 Warner 和 McKenjie^[1] 根据抗血清和 Ly-1, Ly-2/Ly-3, Ly-5 和 Ly-6 抗原的反应,把 T 细胞功能亚群分类如表 3 所示。

表 3 T 细胞功能亚群与 Ly 抗原

T 细胞功能亚群	Ly-1	Ly-2/Ly-3	Ly-5	Ly-6
辅助 T 细胞	+	-	+	-
杀伤 T 细胞	+/-	+	+	+
抑制 T 细胞	-	+	未测	-
迟发型变态反应				
激发性 T 细胞	+	-	未测	-
混合淋巴细胞反应 (MLR)				
(1) 对 H-2K 反应者	+	-	未测	未测
(2) 对 H-2I 反应者	-	+	未测	未测
胸腺细胞	+	+	未测	+

杀伤 T 细胞是否有 Ly-1 抗原的问题,目前仍有争论,多数作者认为该细胞 Ly-1 是阴性,但 Nakayama 等^[13] 用细胞毒研究小鼠脾杀伤 T 细胞对同种白血病细胞和骨髓瘤细胞的细胞毒效应,发现脾细胞和 Ly-1, Ly-2, Ly-3 抗血清及补体共同孵育后,其细胞毒性作用消失;在相同条件下,若把靶细胞换为半同基因的骨髓瘤细胞,则细胞毒效应减

低;若脾细胞经补体和 Ly-1 抗血清处理,再与另一种半同基因的骨髓瘤细胞作用,其细胞毒效应很少受影响,但该细胞用 Ly-2 或 Ly-3 抗血清处理则细胞毒效应完全废除。这些事实提示具有细胞毒效应的杀伤 T 细胞可能在 Ly-1 抗原的表达不是均一的,或者在 Ly-1 的量上是有区别的。Wattstein^[14] 等研究对 H-2 突变 (H-2K^{ba} 和 H-2D^{da}) 细胞有细胞毒作用的杀伤 T 细胞的 Ly 抗原,发现该细胞对 Ly-1 和 Ly-2 抗血清和补体是敏感的,他们认为具有 Ly-1 和 Ly-2 抗原的 T 细胞是有免疫能力的 T 细胞。

用细胞毒方法证明胸腺细胞中 90% 是带 Ly-1, Ly-2/Ly3 抗原的,它们均可被上述抗原的抗血清所裂解。但对考的松耐受的胸腺细胞中只有 35~60% 的细胞被上述抗血清裂解。用同样的方法说明淋巴结细胞中有 60%,脾细胞中有 40% 的细胞带有 Ly-1, Ly-2/Ly-3 抗原^[12]。

Ly 抗原的生化研究尚少,有人报道^[7]用去垢剂提取的膜制剂后,再用免疫沉淀法分离出的 Ly-3.1 抗原,估计其分子量为 40,000~45,000 的糖蛋白,并认为该分子与 β_2 微球蛋白没有联系。

3. 胸腺细胞抗原-1 (Thy-1)

胸腺细胞抗原-1 过去也称为 θ (Theta) 抗原,它不存在于 B 淋巴细胞,故可以认为是 T 淋巴细胞的标志。但它与上述 TL 和 Ly-抗原不同,除了胸腺细胞和外周 T 细胞有此标志外,脑、外周神经组织、纤维母细胞和上皮细胞等非淋巴细胞表面也存在这种标志^[15,16]。

Thy-1 的位点在小鼠第 9 对染色体上,故它既不与 H-2 位点相联系,也不与 Ly-1, Ly-2/Ly-3 位点相联系。它的二个等位基因是 Thy-1^a 和 Thy-1^b, 分别控制 Thy-1.1 和 Thy-1.2 的抗原特异性^[7]。

干细胞从骨髓移行到胸腺皮质区时,即发生 T 细胞分化的一系列形态结构和表面标志的变化。平野隆雄等^[17]用萤光激活细胞分离仪分离出形态、功能,表面标志不同的胸腺细胞,其结果如表 4 所示。

表 4 用萤光激活细胞分离仪分离得到形态、功能和表面标志不同的几种胸腺细胞

细胞大小	所占的%	存在部位	寿	命	耐考的松	Thy-1	TL 抗原	H-2	Fc受体%	GIX 抗原
大	5-7	被膜下层	更新较快		不	+++	++	+	<1	+
中	85-90	深皮质区	长	寿	不	++	+	+	10	-
小	5-7	中 央	长	寿	耐	+	-	++	9	-

由表 4 可知骨髓干细胞移行到胸腺皮质区时获得密度甚高的 Thy-1 抗原,但在进一步分化成熟时,Thy-1 的密度逐渐降低,但并不消失,甚至成熟的 T 细胞离开胸腺进入外周血液和淋巴器官时仍然保持密度较低的 Thy-1 抗原。表 5 说明外周 T 淋巴细胞带 Thy-1 抗原的情况:

因此人们能利用检测 Thy-1 抗原来区分 T、B 淋巴细胞。

Thy-1 抗原的化学本质曾经认为是一种糖脂,但 Kucich 等^[18]用限制性木瓜蛋白酶水解带 Thy-1 的肿瘤细胞得到的制剂,有抑制抗 Thy-1 抗体细胞毒作用。若这制剂再经蛋白水解酶处理,Thy-1 的抗原性消失,故认为 Thy-1 抗原属蛋白质。与此同时,

Trowbridge^[19] 用 ³H-棕榈酸标记胸腺细胞及 T 淋巴瘤细胞的 Thy-1 抗原, 但经分离后

表 5 带 Thy-1 抗原 T 细胞在外周淋巴组织中的分布

组 织	带 Thy-1 抗原 T 细胞 (%)
胸导管淋巴液	80—90
血液	60—85
淋巴结	60—85
脾	25—45
小肠淋巴结	20—40

有 Thy-1 活性的为一种膜表面蛋白, 其分子量为 25,000~30,000, 它不具 ³H-棕榈酸的成分, 但可与植物血凝素结合, 故推测其化学本质为糖蛋白。

4. Gross 病毒抗原 (GIX 抗原)

Gross 病毒抗原是胸腺细胞的表面标志之一, 但亦见于正常脾细胞。此外, GIX 抗原可以由小鼠白血病病毒 (MULV) 诱发, 因此小鼠 T 细胞出现 GIX 可以是遗传因素, 也可以是外源性感染的结果。Stockert^[20] 等认为病毒基因可插入到小鼠的染色体基因, 但表达与否可能受到其他基因的控制, 并认为这种情况可能也存在于 TLa 抗原系统。

从遗传学的分析, 包括从逆代杂交的等位基因分析的资料说明^[7], GIX 抗原具有二个不相联的显性基因 GV-1 (在小鼠 17 对染色体上) 和 GV-2 (在小鼠第 7 对染色体上) 所控制, 它们各有二个等位基因 a 和 b。

Del Villano 等^[21] 用非离子去垢剂提取正常和恶性胸腺细胞膜制剂, 并用特异抗血清分离免疫沉淀物, 再用聚丙烯酰胺凝胶电泳研究病毒蛋白和正常或恶性胸腺细胞表面 GIX 抗原的关系, 已经证明三个病毒蛋白质 (GP70, P45 和 P30) 与 70% 的淋巴瘤相关的, 而 GP70 和 P45 与某些品系小鼠的正常胸腺细胞相关。已经证实 GP70⁻ 的小鼠因白血病而转变为 GP70⁺ 时, 也伴随有 GIX⁻ 转变为 GIX⁺。Obata 等^[22] 用细胞毒方法、免疫荧光和吸附技术证明抗 GP70 的抗血清能沉淀 GIX 抗原并对 GIX⁺ 的胸腺细胞有细胞毒作用。这些事实说明 GP70 是 GIX 抗原的一种成分。Tung 等^[23] 从胸腺细胞膜分离出一种分子量为 70,000 的分子, 具有 MULV GP-70 的抗原性和生物学性质, 并把这分子与纯化的 MULV 中分离的衣壳蛋白进行比较, 认为 GIX 抗原就是 GP70 糖蛋白。但 Tung 等^[24] 比较分析同基因小鼠 GIX⁻ 或 GIX⁺ 的胸腺细胞的 GP70 后发现, GIX⁻ 小鼠胸腺细胞也存在 GP70, 但它与 GIX⁺ 小鼠胸腺细胞的 GP70 不同, 表现在 SDS 凝胶电泳时它们两者的迁移率存在着差别。吉木敬^[9] 认为 C 型病毒的 GP70 作为 G 区抗原存在于 T 细胞膜上, 其分子量为 7 万; 而存在于血流中的 GP70 则分子量为 5.3 万或 4.5 万或 3.2 万。

现将 T 细胞分化过程中同种异体抗原的分布, 变化与细胞功能的关系总结于图 1。

5. 小鼠特异淋巴细胞抗原 (MSLA)

Shingen 等^[25] 用小鼠胸腺细胞免疫家兔制备抗血清, 经小鼠其他组织如红细胞、肝细胞、骨髓细胞或浆细胞吸收后, 对 T 细胞仍具有特异的反应性, 应用这种抗血清已证明小

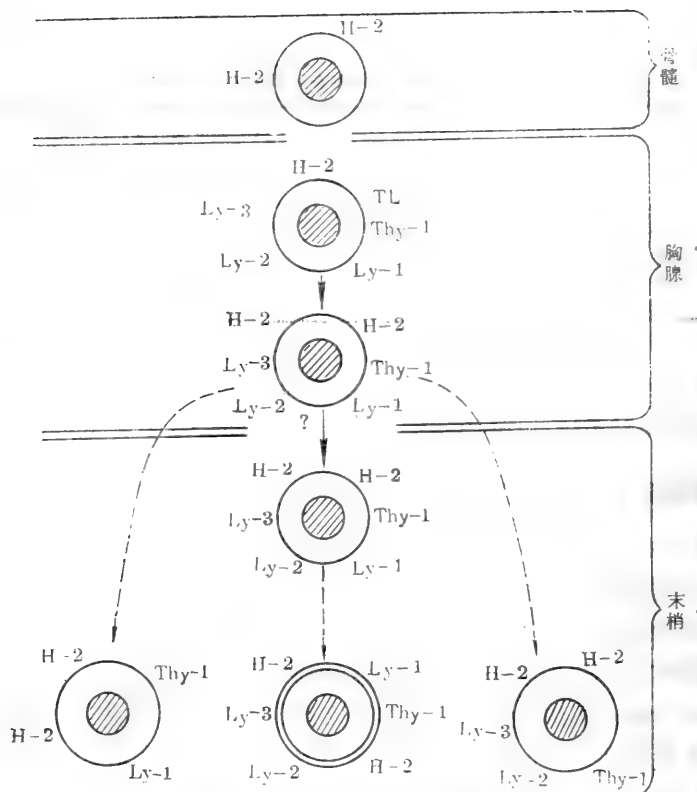


图1 T细胞分化与表面标志的关系

鼠的 T 细胞和胸腺细胞表面存在 MSLA。应用同样的原理亦可制备各类动物的 T 淋巴细胞的异种抗血清，以测定 T 淋巴细胞表面的特异性异种抗原。其中包括制备抗人 T 淋巴细胞血清 (HTLA)，以测定人类 T 淋巴细胞。例如用人胚胎或新生儿胸腺免疫家兔，由此制备的抗血清用 B 淋巴细胞(从慢淋病人胸导管获得)或用脑组织吸收后，即可用以测定人类 T 细胞^[26]。

6. T 细胞的脑相关抗原

用小鼠脑匀浆免疫家兔制备的抗血清，用小鼠各种组织吸收后，此抗血清用荧光技术或细胞毒试验证明能与小鼠的 T 淋巴细胞呈现特异性反应。用这种抗血清测出的 T 淋巴细胞抗原称为脑相关抗原 (BAA)^[27]。已经证明 BAA 存在于所有的 T 淋巴细胞，但不存在于 B 淋巴细胞，故在区分 T、B 淋巴细胞上有应用价值。T 细胞的脑相关抗原的化学本质可能是一种脑苷脂 GD16^[28]。

7. 绵羊红细胞受体

人外周血液淋巴细胞和多数胸腺细胞均能直接与未致敏的绵羊红细胞形成玫瑰花环，并认为具有绵羊红细胞受体的淋巴细胞均属 T 淋巴细胞^[29]。目前国内外很多实验室已将 E-花环试验作为检测 T 淋巴细胞的常规项目^[30]。但是不同的 T 淋巴细胞与绵羊红细胞形成玫瑰花环的能力有差别，已有许多种 E-玫瑰花环试验用以测定不同的 T 细胞，

“活性”玫瑰花环试验即为一例,有人认为它代表T细胞的一个亚群^[31],但尚待进一步证实。

人类T淋巴细胞表面除绵羊红细胞受体外,还存在猴、狗、鼠等红细胞受体,可能是不同于绵羊红细胞受体的另外几种受体^[32]。

用抗淋巴血清预先处理人淋巴细胞,可以抑制E-花环的形成,其抑制的程度与抗T细胞血清杀伤T淋巴细胞的能力相一致。故有人认为T细胞的绵羊红细胞受体可能就是T细胞的特异抗原,或者是与T细胞特异抗原紧密相关的表面成分^[32]。Owen和Fanger^[33]认为E-受体可能是异种抗T血清识别的T抗原之一。因为用胰蛋白、糜蛋白酶、链丝菌蛋白酶处理T淋巴细胞,均可抑制E-花环形成,因而认为,这种受体的化学本质是蛋白质。用神经氨酸酶处理T细胞使E-花环形成更加稳定,进一步说明E-受体可能是一种糖蛋白^[3]。近年来相继报告,人外周血T淋巴细胞经加热45℃处理或胰蛋白酶处理,可使T细胞失去E-花环形成的能力,但这种T细胞经转移因子或胸腺素孵育后,可以部份地恢复该细胞形成E-花环的能力^[34,35]。我们用白细胞“免疫”核糖核酸与加热45℃处理的T淋巴细胞保温,亦使该细胞部分地恢复E-花环的形成,白细胞“免疫”核糖核酸的这种作用在一定范围内与其浓度相关,该制剂经RNase处理则失去恢复玫瑰花环的作用,但胰蛋白酶, DNase处理则不受影响^[36]。

8. T 细胞表面的激素受体

人的T淋巴细胞表面的激素受体有胰岛素受体和人生长激素受体。已经发现建株的人淋巴细胞或新分离的正常人外周血液淋巴细胞经刀豆球蛋白(ConA)诱导转化时均存在胰岛素受体,而且这种受体出现在形态学改变之前,每个转化的淋巴细胞能结合350个胰岛素分子。若把转化的淋巴细胞用磷脂酶C处理,胰岛素受体的数目还可增加^[37]。此外,急淋白血病(属T细胞类型)患者的淋巴母细胞上也有类似数目的胰岛素受体。这些资料提示,胰岛素受体可以作为活化T淋巴细胞一种表面标志。用¹²⁵I标记的人生长激素证明,建株的人淋巴细胞存在人生长激素受体^[38],这种受体不能结合异种动物的生长激素,故有种族特异性。因为新鲜分离的淋巴细胞上没有发现这种受体,故认为与胰岛素受体相似,它的出现与T淋巴细胞的活化状态相关。

9. T 细胞的蜗牛血凝素及花生凝集素受体

已经发现一种蜗牛血凝素能与神经氨酸酶处理的人外周血淋巴细胞中的T细胞呈现特异的结合^[39],但未经神经氨酸酶处理的T细胞不易与蜗牛血凝素结合。最近发现,前胸腺细胞具有花生凝集素受体,但前胸腺细胞在胸腺内发育成熟为胸腺细胞时,花生凝集素受体消失,所以这是一种与T细胞分化相关的表面受体。利用这种特性,即应用花生凝集素来分离前T细胞已成为一种新的分离方法^[40]。国内已开始用荧光标记的花生凝集素观察胸腺素对T细胞分化的作用^[41]。

10. T 细胞表面的病毒受体

Woodruff等^[42]已发现大鼠T淋巴细胞能与甲型流感病毒的某些亚型呈特异的结合。橘武彦^[43]证实T细胞表面具有结合麻疹病毒的受体,B细胞不能结合麻疹病毒,故可利用

病毒来区分 T、B 细胞。

二、存在于 B 淋巴细胞的表面标志

与 T 淋巴细胞表面标志的研究相比, B 淋巴细胞表面标志所知甚少,除表面膜免疫球蛋白 (SmIg) 外,大多是近年来才开始研究的。Katz^[44] 最近对此有过全面的综述,现将几种同种异体抗原 (Ly-4, Ly-7), 异种抗原如小鼠特异 B 细胞抗原 (MBLA)、小鼠特异浆细胞抗原 (MSPCA)、补体受体和 EB 病毒受体等讨论如下:

1. B 淋巴细胞的淋巴细胞表现型抗原系统 (Ly-4, Ly-7)

Ly-4 是 B 淋巴细胞表面存在的同种异体抗原,由 Ly-4 位点所决定的,具有二个等位基因 Ly-4^a 和 Ly-4^b。Ly-4^b 决定 Ly-4,2 抗原,该抗原存在于 C57BL/6, C57BL/10, C57L, C57BR/cd 及 WB 小鼠的 B 淋巴细胞表面。Ly-4,2 抗原阴性的小鼠推测由 Ly-4 等位基因所决定的,后者可能控制 Ly-4,1 抗原(但未经正式确定),如 A,AKR, BALB/c, CBA, C3H, DBA/1, DBA/2, LP, STL, SWR 和 129 等小鼠品系^[44,45]。

用抗 Ly-4 血清作细胞毒试验证明,胸腺细胞和胸导管淋巴细胞中,对抗血清敏感的细胞不超过 5%。脾细胞中对抗血清敏感的细胞为 60%;淋巴结为 40%;腹腔渗出细胞中为 30%;外周血淋巴细胞和骨髓细胞中各占 30%^[46]。

Ly-4,2 阳性细胞的功能与带 Thy-1,2 抗原的细胞不同,用抗 Thy-1,2 血清和抗 Ly-4,2 血清分别处理这两类细胞,再观察这两类细胞所产生的效应,其结果如表 6 所示。

表 6 抗 Thy-1,2 和抗 Ly-4,2 血清分别处理带 Thy-1,2 和 Ly-4,2 抗原细胞后所产生的功能影响

细胞所带抗原	T 细胞对肿瘤细胞的裂解	K 细胞对羊红细胞的裂解	对分裂原的反应		MLC 反应	MLC 的刺激能力	绵羊红细胞玫瑰花环抑制	PFC 抑制	B 细胞分析
			PHA	脂多糖	美洲商陆				
Ly-4,2	-**	-	-	+	+	-	+	+++	+
Thy-1,2	+	-	+	-	+	+	-	+	-

+* 阳性表示抗血清处理后产生抑制作用。
-** 阴性表示抗血清处理后不产生抑制作用。

表 6 说明抗 Thy-1,2 血清能完全抑制 T 细胞对肿瘤细胞的裂解作用和对 PHA 的刺激作用;但抗 Ly-4,2 血清处理对二者均无抑制作用,但可抑制对脂多糖的反应。在 MLC 反应中抗 Thy-1,2 和抗 Ly-4,2 血清处理两类细胞均产生抑制作用,这是因为 MLC 反应中刺激细胞是 B 细胞,而效应细胞是 T 细胞,它们在此免疫反应中是互补的,因此抑制任何一个环节均可产生抑制作用。抗 Ly-4,2 血清强烈抑制非免疫脾细胞与绵羊红细胞形成玫瑰花环,其原因可能是 Ly-4,2 的决定簇和表面膜免疫球蛋白 (SmIg) 在细胞表面空间位置上是紧密相联系的。有关 B 淋巴细胞 Ly 抗原的化学本质,至今仍缺乏研究。

应用 (C57BL/6H-2^d × Cx Bd) F₁ 制备抗 BALB/c 小鼠的抗血清已经确定, B 淋巴细胞表面存在 Ly-7,2 抗原。这种抗血清除对 C57BL/6 小鼠的 B 淋巴细胞不起反应外,对其余品系的小鼠均能起反应。但其功能所知甚少^[4]。

2. 小鼠 B 淋巴细胞抗原 (MBLA)

Raff 等^[46]把切除胸腺并以致死剂量射线照射,再经同种胚胎肝细胞重组小鼠的淋巴结细胞免疫家兔,由此制备的抗血清经小鼠肝和红细胞吸收,再用小鼠胸腺细胞吸收至抗血清对胸腺细胞不再出现细胞毒作用。已经证明,这种抗血清在有补体存在时可以使 30% 的小鼠淋巴结细胞和 55% 的小鼠脾细胞呈现细胞毒效应,因此把这种抗原命名为小鼠 B 淋巴细胞抗原。实际上除 B 细胞外,浆细胞也存在 MBLA,因为免疫小鼠的 PFC 细胞和几种小鼠的骨髓瘤细胞也对上述抗血清呈现细胞毒反应。

用琼脂双扩散及免疫荧光试验证明,抗 MBLA 血清与 B 淋巴细胞的 SmIg 不起沉淀反应,说明 MBLA 不是 SmIg^[47]。由于 MBLA 存在于 B 细胞分化的整个过程,故认为它是一种十分稳定的细胞表面标志^[48]。但需指出的是有人^[49]认为,抗 MBLA 血清中存在识别 Ia 抗原的抗体,因此,有关 MBLA 与 Ia 之间的关系尚待进一步研究。

应用慢淋白血病人外周血淋巴细胞免疫家兔,由此制备的异种抗血清,经适当的吸附后,能特异地结合人扁桃腺 B 细胞上的异种抗原^[50]。也有报告应用类似的方法证明,鸡的 B 细胞上存在类似的特异抗原^[51]。

3. 小鼠特异浆细胞抗原 (MSPCA)

Watanabe 等^[52]用可移植的几种恶性浆细胞瘤或骨髓瘤细胞制备异种抗血清,经小鼠红细胞和正常小鼠血清吸收后,除对瘤细胞有细胞毒作用外,对淋巴结细胞也有细胞毒。抗血清的细胞毒活性可被淋巴结细胞、脾细胞和均一的骨髓瘤细胞吸收掉。经过免疫后的脾细胞、淋巴结细胞有更强的吸收作用,但不被肝、肾和胸腺细胞吸收。因此认为是小鼠浆细胞表面特有的抗原,命名为 MSPCA。

4. 人 B 淋巴细胞的新标志

最近, Brooks 等^[53]分离出一株杂交瘤细胞(一种骨髓瘤细胞与经人 B 细胞免疫的小鼠脾细胞融合建株),能分泌一种抗体,后者能与入淋巴细胞反应,这类淋巴细胞经表面标志鉴定为 B 细胞。由于杂交瘤细胞分泌的抗体所反映的标志与已知的 B 细胞标志均不相同,故作者认为,这是一种新的人 B 淋巴细胞标志。

5. 浆细胞抗原^[54]

从正常或恶性小鼠的浆细胞的血清学分析证明,它们具有 H-2 和另一种称为浆细胞抗原 (PCA-1) 的同种异型抗原。这种抗原也见于肝、脑、肾细胞以及某些品系小鼠的巨噬细胞。因此这种抗原并无组织特异性,但它不出现在于抗体分泌的前驱细胞 (B 细胞) 表面,故在淋巴样细胞中却是浆细胞特异的。

6. 浆细胞-肝-肾-脑抗原 (P、L、K、B)

Yutoku 等^[55]将分泌 IgG 和分泌 IgA 的二种骨髓瘤细胞免疫家兔制备异种抗血清,经体内吸收纯化后,可以测出一种存在于正常或恶性浆细胞上的新表面抗原。这种抗原不存在于其他的淋巴样细胞,但存在于肝、肾和脑细胞上。因此它不是浆细胞特异抗原,

这是不同于上述的 MSPCA 的。它与 PCA-1 抗原也不同,后者虽也出现于某些非淋巴样细胞,但若小鼠是 PCA-1 阴性的品系,其肝、肾、脑细胞上也不存在 PCA-1 抗原,但这种小鼠仍存在浆细胞-肝-肾-脑抗原,说明这两者为二种不同的表面抗原。

7. 补体受体 (CR)

补体受体已被确定为 B 淋巴细胞的一类膜标志^[56]。它可以用抗体致敏的绵羊红细胞和补体与 B 淋巴细胞形成玫瑰花环来检测。由此形成的玫瑰花环称为 EAC 花环,而把这类淋巴细胞称为补体受体淋巴细胞 (CRLs)。现已确定 CRLs 存在于某些动物和人类。虽然现在都认为 CRLs 均属 B 淋巴细胞,但是否所有的 B 细胞均有 CR 尚存在争论。因为不论是人和动物的淋巴样细胞中,经常发现带 SmIg 的细胞比带 CR 的细胞为多,而 SmIg 也是一种公认的 B 淋巴细胞的膜标志,由此认为 CRLs 只是 B 淋巴细胞的一个亚株^[57]。但另一些人不同意这种看法,他们认为 B 淋巴细胞上的 CR 在体内可以受到补体结合的复合物或补体的降解产物的封闭,由此造成二种膜标志测定结果上的差异;也可能是用玫瑰花环方法测补体受体的灵敏度远比测定 SmIg 的方法的灵敏度低而造成这种差别。

从发生学的研究证实,小鼠 B 淋巴细胞的 CR 出现比 SmIg 要晚^[58],但当 B 细胞分化成熟为浆细胞时 CR 又消失,因此认为 B 淋巴细胞的补体受体也是一种分化相关的标志。应用同基因小鼠已经测出 CRL-1 的位点,它是控制 CRL 分化的位点之一,这个位点可能位于 H-2D 的邻近处^[59]。

有关补体受体的化学本质所知甚少。已知它对胰蛋白酶敏感,故推测可能是一种蛋白质。用抗 Ig 血清处理 B 细胞并不抑制 EAC 花环的形成,说明补体受体与 SmIg 是无关的二种分子。

补体受体的功能是一个正在研究的课题,Katz^[44]提出补体受体可能在使抗原区域化的过程中起作用,也可能它对 B 细胞起“启动”的作用或者在免疫细胞间相互作用时起作用。日本学者行山康^[60]最近根据 B 细胞激活的双信号学说提出, C₃ 作用的可能机制如图 2 所示。

8. EB 病毒受体

在组织培养中已经证实,EB 病毒能使人淋巴细胞转化为淋巴样母细胞^[61],而 EBV 的基因组可出现在这种培养的淋巴细胞株中^[62]。但这种情况只见于 B 淋巴细胞,不见于 T 淋巴细胞,故认为 B 淋巴细胞表面存在着 EBV 的特异受体。进一步证明 B 淋巴细胞上存在这种特异受体的实验是将含 EBV 的淋巴细胞的提取物加到培养的人淋巴细胞悬液中,然后再加入萤光标记的 EBV 抗体,结果发现 EBV 能直接结合到淋巴细胞上。把这种 EBV 结合试验阳性的细胞,再测 T、B 淋巴细胞的表面标志,从而证实,结合 EBV 的淋巴细胞是 B 淋巴细胞^[3],故可以把 EBV 受体看作为 B 淋巴细胞的特异表面标志。

9. B 细胞的表面膜免疫球蛋白 (SmIg)

应用异种抗免疫球蛋白血清或同种异型抗血清研究各种动物的淋巴细胞证实这类细胞的表面上有表面膜免疫球蛋白存在,并认为这类淋巴细胞属于 B 细胞,故可把 SmIg 看

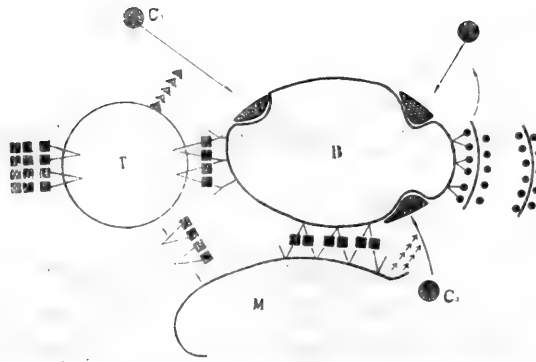


图2 C₃ 在B细胞激活的双信号中的作用

作为B淋巴细胞的一种特异表面标志^[63]。虽然有人报告,哺乳类的T淋巴细胞也有 SmIg,但这种 SmIg 是T细胞合成的还是由浆细胞合成的 Ig 再吸附到T淋巴细胞表面,尚是一个有争论的问题。又T细胞表面的 SmIg 主要是 IgM,且其含量远较B细胞为少,说明无论从 SmIg 的质或量来看,T、B 细胞均存在着差别。

用 SmIg 作为B淋巴细胞的标志来观察不同的淋巴器官、外周血液或胸导管淋巴细胞中B细胞的比例,各实验室的结果差别甚大。造成这种差别的原因有方法学的问题;但更重要的是早期的研究还不知道B细胞表面存在 Fc 受体,后者可以结合 Ig 分子的 Fc 部分,从而使B细胞的 SmIg 数值增大。

Lobo 等^[64]用免疫荧光法测定人外周血淋巴细胞时发现,温度对 SmIg 淋巴细胞数有很大的影响。4℃时 SmIg 淋巴细胞平均值为 32%;而室温时平均值为 18%;若在 37℃平均值减低到 9%。这些数字说明,B淋巴细胞表面膜免疫球蛋白存在着对温度稳定的决定簇和对温度不稳定的决定簇。在控制实验的条件下,得到人外周血液中带 SmIg 的淋巴细胞为 8—10%,胸导管淋巴细胞中带 SmIg 的细胞为 23%,脾中为 27%,淋巴结为 23%,而胸腺中少于 1~2%。

B淋巴细胞通常只表达一个轻链和一个重链基因。但在抗原诱导分化时,SmIg 的质和量都发生变化。未受抗原刺激的细胞其 SmIg 大部分是 IgM,而当抗原激活B细胞时,SmIg 变为以 IgG 为主^[63]。人类中还可看到,B细胞个体发生的某个阶段和B细胞发生恶变时,其 SmIg 变为 IgD^[1]。Yitetta 和 Uhr^[65]注意到新生小鼠B淋巴细胞表面 SmIg 为 IgM,第 10~14 天则为 IgD。成年动物骨髓淋巴细胞中只带 IgM,没有 IgD。而在脾淋巴细胞中转变为带 IgD 时不需要抗原刺激,也不依赖T细胞。因为裸鼠的脾淋巴细胞也具有正常量的 IgD,故他们认为B淋巴细胞上的 IgD 可以作为“启动”免疫反应的受体,当 IgD 与抗原相互作用,可以对B细胞发出诱导信号;在 IgD 出现前,抗原与 SmIgM 作用,则产生免疫反应的耐受信号。因此 SmIgD 不只是B淋巴细胞分化的表面标志,而且与B淋巴细胞的免疫功能密切相关的。最近, Lin 和 Putnam^[66]用二步分离法得到人的血清 IgD,用化学法和酶降解法研究 IgD 的分子结构并与 SmIgD 进行比较,他们发现 SmIgD 的分子结构比血清 IgD 稳定,因为要把 SmIgD 降解为 Fab₂ 和 Fc₂ 碎片需要更高的酶浓度和更长的保温时间。并认为这是因为 SmIgD 的铰链区受到隐蔽所致。并推理抗原结合后有利于该区域的暴露,或者抗原-Fab 与 Fc 解裂,使 Fc

段暴露,从而使 B 淋巴细胞获得免疫信息。有人报告^[67] B 淋巴细胞分化成熟过程中 SmIg 浓度降低,到浆细胞的阶段 SmIg 是很低的。

三、存在于 T、B 淋巴细胞表面的共同标志

1. 组织相容性抗原

Katz^[68] 最近对存在于 T、B 淋巴细胞的共同标志作了综述。在 小鼠中主要的组织相容性抗原是 H-2 复合物。它们的基因存在于第 17 对染色体上,有五个亚区组成,分别命名为 K、I、S、G 和 D。其中 I 区更细分为 IA, IB, IJ, IE 和 IC 五个次亚区。K 区和 D 区主要决定个体特异性表面抗原,除了 T、B 淋巴细胞有这些表面抗原外,它们也存在于其他细胞表面,是引起同种移植排斥的抗原。I 区中的 IA、IE 和 IC 含有免疫反应基因 (Ir-基因),它们控制机体对某些合成抗原、蛋白质、同种异体抗原的反应能力。但 Ia 基因与 H-2K 和 H-2D 不同,其组织分布有较严格的限制,只存在于 T、B 淋巴细胞、巨噬细胞和上皮细胞,不存在于红细胞、肝、肾、脑和纤维细胞。在淋巴细胞中 A 次亚区还含有最强的淋巴细胞确定的位点 (LD 位点),这个位点在混合淋巴细胞反应 (MLR) 中具有促进细胞分裂决定簇的密码。最近还确定 IJ 次亚区有控制抑制 T 细胞的功能。IE 次亚区的功能目前尚不清楚,而 S 区最早认为在血清蛋白含量的控制中起作用,现在知道与血清总补体的含量有关,已经证实该区域含有 C₄ 的结构基因。G 区含有红细胞决定簇的密码,这种决定簇也见于淋巴细胞的表面。小鼠 H-2 复合物的基因结构与功能总结如图 3。

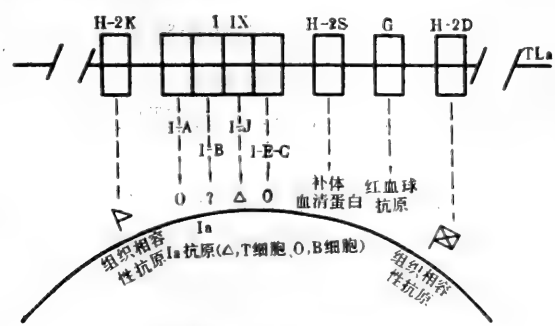


图 3 小鼠 H-2 复合物的基因结构与功能

人类的主要组织相容性抗原为 HLA,它也是一类复合物,有四个不同的位点所组成,即 HLA-A, HLA-B, HLA-C 和 HLA-D。图 4 是人的 HLA 复合物与小鼠 H-2 复合物的基因结构相互比较。但人 HLA 位点在第 6 对染色体上。在功能上,人的 HLA-A 和 HLA-B 相当于小鼠的 H-2K 和 H-2D, HLA-D 相当于小鼠的 I 区,它在 MLR 中具有刺激细胞增生决定簇的密码和贮藏 “Ia-样” 分子的密码。最近 Charron 和 McDevitt^[69] 用单株抗体证明 HLA-D 位点与小鼠 I 区相似,具有多个亚区组成的复合体,而且具有与小鼠 I 区相同的组织学分布。在 HLA-B 和 HLA-D 之间贮存着补体-2 (C₂) 和补体-4 (C₄) 的密码。

用抗 H-2 异种抗血清作细胞毒试验来检测 H-2 抗原的组织学分布,已经证明,胸

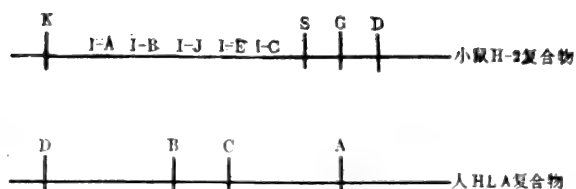


图 4 人 HLA 复合物与小鼠 H-2 复合物的基因结构比较。

腺细胞比脾细胞和淋巴结细胞有较强的耐受性,若以溶解淋巴结细胞的值作为 100%,那末胸腺细胞只占 8~15%。若比较胸腺细胞和淋巴结细胞吸收抗血清的能力,也证明淋巴结细胞吸收能力比胸腺细胞大 5~10 倍。这些资料说明胸腺细胞的 H-2 复合物浓度远较脾、淋巴结的淋巴细胞为低。

H-2K 和 H-2D 基因产物的功能,过去比较侧重于血清学测定和组织移植排斥的抗原性方面,而且已经说明这是一个极其复杂的问题,如 Klein^[70] 已经估计小鼠的 H-2K 至少有 56 个等位基因,而 H-2D 至少有 45 个等位基因,单就这二个位点就有 2,500 种不同的组合。由此可以想象,同种移植排斥的复杂性,可以说 90% 以上的小鼠这二个位点是杂合子。最近发现, H-2K 和 H-2D 的产物也是一种“分化”抗原,而且在细胞免疫中,尤其是大多数病毒感染中起着重要的作用^[68]。

H-2 抗原的生化研究虽已进行二十多年,直至最近由于方法学的进步才取得较大的进展。现在知道它是一种膜结合的疏水糖蛋白^[71]。用去垢剂溶化抽提,并用异种抗血清沉淀分离,再经聚丙烯酰胺凝胶电泳得到一种可用经典的血清学检测的移植抗原分子,分子量为 45,000 (单体)。它与分子量为 12,000 的小肽以非共价键相连,后者经氨基酸的顺序分析,证明为 β_2 微球蛋白^[72]。最近 Jay^[73] 提取小鼠肝细胞 H-2 组织相容性抗原的 mRNA,用肝无细胞系统观察其翻译产物,并以此来研究 H-2 抗原的基因结构及其表达。他们用抗 H-2 血清沉淀翻译产物,得到分子量为 45,000 和 44,500 的二种分子。并认为这种方法有可能进一步探讨 H-2K 和 H-2D 的多型性提供新的途径。

2. I 区相关抗原 (Ia 抗原)

利用 H-2K 和 H-2D 相同,但 I 区和 S 区不同的同基因小鼠间交叉免疫制备抗血清,能用以检测由 I 区和 S 区基因决定的细胞表面抗原。但 S 区的差别不能产生具有细胞毒性的抗血清,因此这种抗血清实际上只能测出 I 区差异而出现的抗原。利用这种抗血清测出的抗原称为 Ia 抗原。

早年发现,抗 Ia 血清只可测出 B 淋巴细胞上的 Ia 抗原,不能测出 T 细胞上的 Ia 抗原,故曾认为 Ia 抗原是 B 细胞的特征性标志^[74]。但近年来已证明, Ia 抗原也存在于 T 细胞,只是 Ia 的量可能比 B 细胞少或者分布方式上与 B 细胞有所不同^[75]。Krammer^[76] 等用灵敏的微量细胞毒方法证实 5~10% 胸腺细胞, 20~30% 耐考的松的胸腺细胞, 60~70% 淋巴结细胞、60~80% 激活 T 细胞均有 Ia 抗原。Murphy 等^[77] 认为功能上属抑制性细胞的均存在 Ia 抗原,而且切除胸腺的新生鼠的淋巴结细胞对抗 Ia 血清细胞毒的敏感性减低,吸收试验也证明胸腺细胞有吸收抗 Ia 血清的作用。

Ia 抗原的功能是一个正在探讨的课题, Fathman 等^[78]用抗 Ia 血清观察小鼠混合淋巴细胞培养,发现抗 Ia 血清有封闭 MLC 的刺激作用(但不封闭其效应作用),由此说明, Ia 抗原可能是淋巴细胞引起 MLR 的受体,或者可能是 Ia 与引起 MLR 的决定簇在细胞表面的空间排列上是紧密相关的。Dickler 等^[79]发现抗 Ia 血清有抑制聚合的免疫球蛋白与淋巴细胞 Fc 受体结合的作用,因此认为, Ia 可能与 Fc 的功能相关或 Ia 和 Fc 受体在细胞表面的空间上密切相关的。有人用抗 Ia 血清和抗 Ly-4 血清观察它们对淋巴细胞的 Fc 受体形成玫瑰花环的影响,发现两种抗血清均能产生部分抑制作用,由此认为 Ia 和 Fc 在细胞表面上密切相关^[4]。但是 Halloran 等^[80]用 B 细胞的其他成分包括 H-2K, H-2D, β_2 微球蛋白, Ly-4,2 的抗血清均能得到抗 Ia 血清一样的结果,诸如抑制聚合的 Ig 与 Fc 的结合或抑制玫瑰花环的形成,因此排除了上述解释的可能性,并提出抗 Ia 血清对 Fc 受体的抑制作用可能是抗体结合到膜抗原后产生的一种诱导效应。

Ia 抗原具有 H-2K 和 H-2D 的共同性质,如两者都见于淋巴细胞, B 细胞上 Ia 的量大于 T 细胞,且亦与组织相容性(移植排斥)相关。但 H-2I 和 Ia 是否就是同一分子,至今尚未清楚。然而从 H-2K, H-2D 和 I 区产物的生化研究结果,说明它们之间是有差别的。如前所述, H-2K 和 H-2D 的产物是一类糖蛋白,分子量为 45,000, I 区产物可能也是一种糖蛋白,分子量大约为 30,000^[71]。用 ³H-氨基酸或 ³H-糖与淋巴细胞保温,使合成膜标记大分子,然后抽提这种标记大分子,在非还原的条件下,经 10% SDS-聚丙烯酰胺电泳后得到单一分子,分子量为 58,000,而在还原条件下,可以分出二个成分,分子量各为 33,000 和 25,000,进一步说明 I 区具有两条肽链的密码,而这两条肽链以二硫键相联。在膜上这两条链以单分子形式存在。用蛋白酶、混合糖苷酶分别处理,证明 Ia 抗原性存在于蛋白部分。对不同种族的 Ia 抗原特异性研究说明,所有 Ia 次亚区的 Ia 抗原特异性相同,但 Ic 次亚区的 Ia 抗原则各不相同^[81]。

3. Ly-8 抗原

用 AKR 小鼠的淋巴细胞免疫 C3H 小鼠制备的抗血清,可以证明,有另一种同种异型抗原存在于 C57BL/10, C57L DBA/2, SJL 小鼠,但不存在于 DBA/I,已把这类抗原称为 Ly-8,2 其位点命名为 Ly-8,其等位基因为 Ly-8^b。Ly-8,2 是一种既存在于 T 淋巴细胞,也存在于 B 淋巴细胞的同种异型抗原。有关它的种系发生,生物学意义和生物性状所知甚少。

4. 胸腺-B 细胞共同抗原 (Th-B)

用兔制备抗小鼠骨髓瘤细胞(一种产生 IgM 浆细胞瘤 MUPC-1046)抗血清,经体内吸收纯化后,可用以检测小鼠浆细胞和胸腺细胞上存在的一种新的表面抗原^[82]。因为这种抗原也存在于胸腺细胞上,故不是浆细胞特异抗原,它也不是 P-K-L-B 抗原,因为肝、肾、脑细胞表面不存在这种抗原。现已证明, IgM 型浆细胞瘤抗血清对免疫小鼠的空斑形成细胞(PFC)亦有细胞毒作用,而且对产生 IgM 的 PFC 的细胞毒效应比产生 IgG 的 PFC 为大。随后的实验又证明,成熟的 B 细胞也存在这种抗原,故把它命名为胸腺-B 细胞共同抗原^[83]。

5. Fc 受体

淋巴细胞表面存在免疫球蛋白 Fc(Ig-Fc) 受体,故可在无补体的条件下直接与 Ig-Fc 或抗原-IgFc 相结合,据此可以与补体受体相区别。测定 Fc 受体的方法有三种:一种是用可溶性抗原-抗体复合物 (Ag-Ab) 直接与淋巴细胞结合,也可先把抗体与细胞保温,然后再加入抗原,使其形成抗原-抗体复合物。若只用抗体不用抗原,则 IgFc 与受体结合不牢固,在洗涤时可以被洗脱。第二种方法是加热使 Ig 分子成为聚合的 Ig,后者可与淋巴细胞形成稳定的结合,第三种方法是国内外应用最多的,即用抗体致敏的绵羊红细胞与淋巴细胞形成玫瑰花环 (EA 花环)。

早期的研究认为,只有 B 淋巴细胞表面存在 Fc 受体,随后发现不仅 B 细胞,而且 T 细胞、甚至不具 T、B 细胞标志的 K 细胞(裸细胞)以及巨噬细胞、粒细胞等均存在 Fc 受体。B 淋巴细胞上的 Fc 受体不同于补体受体,因为 (1) 后者与抗原-抗体复合物结合需有补体存在; (2) 补体受体对胰蛋白酶敏感,而 Fc 受体对胰蛋白酶不敏感; (3) Fc 受体与抗原-抗体复合物结合可被聚合的 Ig 所抑制,但聚合的 Ig 对补体受体不受影响; (4) 淋巴细胞上的补体受体与 EAC 结合可以受抗原-抗体-补体复合物抑制,但后者对 Fc 受体无影响; (5) 眼睛蛇毒因子 (CoF) 可以抑制补体受体,但对 Fc 受体无影响^[84]。B 细胞的 Fc 受体更不同于 SmIg, 因为用抗 Ig 抗体封闭 SmIg 并不减低 Fc 受体与抗原-抗体复合物或聚合的 Ig 的结合^[85]。由于骨髓干细胞及成熟浆细胞不存在 Fc 受体,因此有人认为, Fc 受体是成熟 B 细胞的一种表面标志^[86]。

现在比较一致的看法是抗原反应时激活 T 细胞 (ATC) 具有 Fc 受体。应用 EA 花环技术检查正常小鼠胸腺中静止 T 细胞或经皮质素处理后的早期胸腺细胞上 Fc 受体很少;但皮质素处理后第六天,此时胸腺内细胞再生已经开始,其细胞表面 Fc 受体出现的频率增高到 51%。而在脾和淋巴结的激活 T 细胞上 Fc 受体的频率高达 85% 以上。说明 T 细胞上 Fc 受体的出现与 T 细胞的功能状态有关。激活 T 细胞的 Fc 受体不同于 B 淋巴细胞的 Fc 受体,因为 B 细胞的 Fc 受体与 EA 结合可受到游离的 Ig 或 Ag-Ab 复合物抑制,但激活 T 细胞的 Fc 受体与 EA 的结合只受 Ag-Ab 复合物抑制,游离的 Ig 不具这种抑制作用。而且这两种细胞上的 Fc 受体对聚合 Ig 的分子数有不同要求, B 细胞的 Fc 受体可用少于 100 个 Ig 分子的聚合物来检测,但 T 细胞的 Fc 受体则要 100 个以上的 Ig 分子的聚合物才能检测^[87]。运用同一种方法还证明, B 细胞 Fc 受体的密度要比 T 细胞高。聚合 Ig 与 T 细胞的结合很不稳定,在 37℃24 小时后聚合 Ig 与结合数要比室温降低 10 倍。这些事实提示: 可能 T、B 细胞上存在着不同的 Fc 受体或者 T、B 淋巴细胞上存在一种以上的 Fc 受体。

Fc 受体对胰蛋白酶,糜蛋白酶和神经氨酸酶均不敏感,但对链球菌蛋白酶和磷脂酶 A 敏感^[88], 因此认为, Fc 受体是由细胞膜上的磷脂蛋白组成的。Rask 等^[89]从小鼠脾细胞膜上分离出一种膜制剂,经超速离心的上清液,再用琼脂糖-4B 联结人的聚合 Ig 柱作亲和层析,所得洗脱液以 SDS-聚丙烯酰胺电泳可分离得到三个组分,是分子量各为 65,000, 18,000 和 15,000 的多肽链,其中分子量 65,000 的分子为糖蛋白。用这三个组分制备抗血清,能特异地与淋巴细胞的 Fc 受体结合,说明它们都是 Fc 受体的组成成分。

Fc 受体的功能是重要的研究课题之一。已知一种带 Fc 受体的淋巴细胞是依赖抗

体的细胞介导的细胞毒效应细胞 (ADCC), 已命名为 K 细胞。K 细胞无需事先致敏, 并在缺乏补体时即可杀伤 IgG 型抗体致敏的靶细胞, 在体内有重要的作用^[68]。有关 K 细胞, NK 细胞 Fc 受体及 Fc 受体在人类 T 细胞亚群的检测及其意义见本书的另文。

6. T、B 淋巴细胞表面的有丝分裂原受体

研究有丝分裂原激活淋巴细胞合成 DNA 的机制, 是近代免疫学的一个重要内容, 许多报道指出, 各种有丝分裂原对 T、B 淋巴细胞的作用是有选择性的。例如可溶性植物血凝素 (PHA), 刀豆素 (ConA) 选择性地作用于 T 淋巴细胞, 而脂多糖及其他蛋白质和多糖的聚合物作用于 B 淋巴细胞, 并以此说明, 这些淋巴细胞表面各有相应的特异受体。但这并不是绝对的, 因为改变这些有丝分裂原的物理状态, 就可使它们对 T、B 淋巴细胞的选择性发生变化。例如提高局部有丝分裂原的浓度或将 ConA 或 PHA 结合在颗粒上, 就可刺激 B 细胞。这些实验提示 T、B 细胞上均存在这些有丝分裂原受体。用标记有丝分裂原直接检查淋巴细胞的利用率, 也说明 T、B 细胞结合有丝分裂原的量是类似的^[90]。这些研究说明 T、B 细胞功能上的差别, 并不必然反映在细胞表面受体上有差别或结合活性上有差别。

参 考 文 献

- [1] Warner, N. L. and McKenjie, I. F. C., Surface antigen and receptors of normal and neoplastic lymphocyte: Nature and Distribution. The Lymphocyte Structure and Function Part II. 1977, 433, Marchalonis, I. J. (ed.), Marcel Dekker Inc, New York and Basel.
- [2] Boyse, E. A., and Old, L. J., *Ann. Rev. Genet.*, 1969, **3**, 276.
- [3] Komuro, K., and Boyse, E. A., *Lancet*, 1973, **1**, 740.
- [4] Goldstein, G., *Nature*, 1974, **247**, 11.
- [5] Scheid, M. P. et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1975, **249**, 531.
- [6] Storrie, B. et al., *J. Immunol.*, 1976, **116**(5), 1358.
- [7] Katz, D. H., Lymphocyte Differentiation, Recognition and Regulation., 1977, **9**. Kitz, D. H. (ed.), Academic Press. New York, San Francisco, London.
- [8] Vitetta, E. S. et al., *Cell. Immunol.*, 1972, **4**, 187.
- [9] Schwartz, B. D. & Nathsaon, S. G., *J. Immunol.*, 1971, **107**, 1363.
- [10] Ostberg, L. et al., *Nature (London)*, 1975, **253**, 735.
- [11] Vitetta, E. S. et al., *J. Immunol.*, 1975, **114**, 252.
- [12] Cantor, H. & Boyse, E. A., *J. Exp. Med.*, 1975, **141**, 1376.
- [13] Nakayama, E. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1979, **76**, 1977.
- [14] Wattstein, P. J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1979, **76**, 3455.
- [15] Stern, P. C., *Nature (London) New Biol.*, 1973, **246**, 76.
- [16] Scheid, M. P. et al., *J. Exp. Med.*, 1972, **135**, 938.
- [17] 平野隆雄等: 临床免疫, 1979, **11**, 660.
- [18] Kueich, U. N., *J. Immunol.*, 1975, **115**, 626.
- [19] Trowbridge, I. S., *Nature (London)*, 1975, **256**, 652.
- [20] Stockert, E. et al., *J. Exp. Med.*, 1971, **133**, 1334.
- [21] Del Villano, B. C. et al., *J. Exp. Med.*, 1975, **141**, 172.
- [22] Obata, Y. et al., *J. Exp. Med.*, 1975, **141**, 185.
- [23] Tung, T. S. et al., *J. Exp. Med.*, 1975, **141**, 198.
- [24] Tung, T. S. et al., *J. Exp. Med.*, 1975, **142**, 518.
- [25] Shingen, N. et al., *Lancet*, 1968, **2**, 320.
- [26] Owen, F. L. & Fanger, M. W., *J. Immunol.*, 1974, **113**, 1128.
- [27] Golub, E. S., *Cell Immunol.*, 1971, **2**, 353.
- [28] Esselman, W. J., & Miller, H. C., *J. Exp. Med.*, 1974, **139**, 445.
- [29] Whittingham, S., & Mackay, I. R., *Cell Immunol.*, 1973, **6**, 362.

- [30] WHO Technical Report, *Scand. J. Immunol.*, 1974, **3**, 521.
- [31] 余新生等: 上海医学, 1979, **2**(5), 57.
- [32] Galili, U. & Schlesinger, M., Studies on the formation of E-Rosette by human T lymphocyte and thymus cells; effect of temprature, metabiolic inhibitor and anti-T sera. *Lymphocytes and Their Cell Membranes*. 1976, 129 Schlesinger, M. (ed.), Academic Press, New York, San. Francisco. London.
- [33] Owen, F. L. & Fanger, M. W., *J. Immunol.*, 1974, **113**, 1138.
- [34] Mendes, N. F. et al., *Cell Immunol.*, 1975, **17**, 560.
- [35] Valdimarsson, H. & Mcquire, R. L., *Clin. Exp. Immunol.*, 1977, **29**, 261.
- [36] 邵国英等: 细胞生物学杂志, 1981, **4**, 24.
- [37] Gavin III, J. R. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1972, **65**, 747.
- [38] Lesniak, M. A. et al., *Nature (New Biol.)*, 1973, **241**, 20.
- [39] Hammarotrom, S. et al., *J. Exp. Med.*, 1973, **138**, 1270.
- [40] Reisner, Y. et al., *Cell Immunol.*, 1976, **25**, 129.
- [41] 潘碧霞等: 上海免疫学杂志, 待发表。
- [42] Woodruff, J. F. & Woodruff, J. J., *J. Immunol.*, 1974, **112**, 2176.
- [43] 橘武彦: 临床免疫, 1979, **9**, 118.
- [44] Katz, D. H., *Lymphocyte Differentiation. Recognition and Regulation*. 1977, 40, Academic Press. New York San Francisco, London.
- [45] Snall, G. D. et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 1973, **70**, 1108.
- [46] Raff, M. C. et al., *Nature (London)*, 1971, **230**, 50.
- [47] Niederhuber, J. E. et al., *J. Immunol.*, 1972, **109**, 366.
- [48] Ryser, J. E. & Vassalli, P., *J. Immunol.*, 1974, **113**, 719.
- [49] Niederhuber, J. E. & Moller, E., *Cell Immunol.*, 1972, **3**, 559.
- [50] Greaves, M. F. & Brown, G., *Nature (London) New Biol.*, 1973, **246**, 116.
- [51] Mcarthur, W. P. et al., *J. Exp. Med.*, 1971, **134**, 1036.
- [52] Watanabe, T. et al., *J. Immunol.*, 1971, **106**, 1213.
- [53] Brooks, D. A. et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 1980, **39**, 477.
- [54] Takahashi, T. et al., *J. Exp. Med.*, 1970, **131**, 1325.
- [55] Yutoku, M. et al., *J. Immunol.*, 1974, **112**, 911.
- [56] Lay, W. H. & Nussenjweig, V., *J. Exp. Med.*, 1968, **128**, 991.
- [57] Ross, G. D. et al., *J. Clin. Invest.*, 1973, **52**, 377.
- [58] Gelfand, M. C. et al., *J. Exp. Med.*, 1974, **139**, 1125.
- [59] Gelfand, M. C. et al., *J. Exp. Med.*, 1974, **139**, 1142.
- [60] 行山康: 临床免疫, 1980, **12**, 17.
- [61] Pattengale, P. K. et al., *Lancet*, 1973, **2**, 93.
- [62] Zur-hausen, H. & Schulte-Holthausen, H., *Nature (London)*, 1974, **227**, 245.
- [63] Katz, K. H., *Lymphocyte Differentiation, Recognition and Regulation*, 1977, 152. Academic press, New York, San Francisco, London.
- [64] Lobo, P. et al., *J. Immunol.*, 1975, **114**, 116.
- [65] Yitetta, E. S. & Uhr, J. W., *Science*, 1975, **189**, 964.
- [66] Lin, L. C. & Putnam, F. N., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1979, **76**, 6579.
- [67] Perkins, W. D. et al., *J. Exp. Med.*, 1972, **135**, 267.
- [68] Katz, K. H., *Lymphocyte Differentiation, Recognition and Regulation*. 1977, 70, Academic press, New York, San Francisco, London.
- [69] Charron, D. J. & McDevitt, D. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1979, **76**, 6567.
- [70] Klein, J., *Science*, 1979, **203**, 576.
- [71] Nathenson, S. G. & Cullen, S. E., *Biochem. Biophys. Acta*, 1974, **344**, 1.
- [72] Silver, J. & Hood, L., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 1976, **73**, 599.
- [73] Jay, G. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1979, **76**, 6565.
- [74] Sachs, D. H. and Cone, J. E., *J. Exp. Med.*, 1973, **138**, 1289.
- [75] Frelinger, J. A. et al., *J. Exp. Med.*, 1974, **140**, 1273.
- [76] Krammer, P. H. et al., *J. Exp. Med.*, 1975, **142**, 1403.
- [77] Murphy, D. B. et al., *J. Exp. Med.*, 1976, **144**, 699.
- [78] Fathman, C. G. et al., *J. Exp. Med.*, 1974, **140**, 853.
- [79] Kickler, H. B. & Sachs, D. H., *J. Exp. Med.*, 1974, **140**, 779.
- [80] Halloran, P. & Schirmmacher, V., *Fc receptors and Ia antigens. Immunology of Receptors*. Immunology of Receptors, Immunology of Receptors, Immunology of Receptors.

- logy Series, 6, 1977, 201, Cinader Marcel Dakker B. (ed). Inc. New York and Basel.
- [81] Murpy, V. B. & Shreffler, D. C., *Transplantation*, 1975, **20**, 443.
 - [82] Yutoku, M. et al., *J. Immunol.*, 1974, **112**, 1774.
 - [83] Yutoku, M. et al., *J. Immunol.*, 1975, **115**, 69.
 - [84] Eden, A. et al., *Cell. Immunol.*, 1973, **71**, 459.
 - [85] Basten, A. et al., *J. Exp. Med.*, 1972, **135**, 610.
 - [86] Basten, A. et al., *J. Exp. Med.*, 1972, **135**, 627.
 - [87] Anderson, C. L. & Grey, H. M., *J. Exp. Med.*, 1974, **139**, 1175.
 - [88] Dickler, H. B., *J. Exp. Med.*, 1974, **140**, 508.
 - [89] Rask, L. et al., *Nature (London)*, 1975, **257**, 231.
 - [90] Muller, G. et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 1973, **13**, 89.
 - [91] 吉木敬: 临床免疫, 1979, **11**, 425.

抑制细胞在免疫调节中的作用

吴 慧 君

(四川医学院微生物学教研组)

- | | |
|--------------------|----------------------|
| 一、前言 | 1. 免疫耐受性 |
| 二、抑制细胞的种类 | 2. 抗原竞争 |
| 三、各类抑制细胞的特性 | 3. 对胸腺不依赖抗原免疫反应的调节作用 |
| 1. 抑制性 T 淋巴细胞 (Ts) | 4. IgE 抗体反应的调节 |
| 2. 抑制性 B 淋巴细胞 | 5. 基因控制的特异性免疫反应的调节 |
| 3. 巨噬细胞 | 6. 有丝分裂原激活的免疫抑制 |
| 4. 骨髓中的抑制细胞 | 7. 同种型及独特型抑制作用 |
| 四、抑制细胞在免疫调节中的作用 | 五、关于抑制细胞产生抑制效应的机制问题 |

一、前 言

近十年来,日益增多的证据说明,机体的免疫反应是一种极为精细、复杂而又完善的生物学的防御过程,是由一些具有辅助、增强及抑制功能的细胞和体液因子,相互作用进行调节的一种反应,也就是说,免疫反应是由一系列起调节作用的因子所控制和调节的。根据已有的实验资料证明,那些有抑制功能的细胞,在免疫反应的调节作用中,起着尤为重要的作用。因此对于这些抑制细胞的种类、性质及功能的研究,成为近年来重要研究课题之一。

已发现在动物和人类的某些免疫性疾病中,常有抑制细胞异常的情况,如在免疫缺陷病、再生不良性贫血,常见的未分类的低丙球蛋白血症、多发性骨髓瘤、全身性红斑狼疮、一些慢性传染病如反复发生疱疹、真菌感染以及椎虫等寄生虫的感染等。在 NZB/W 小鼠中出现的红斑狼疮样疾病,以及其他的动物实验结果,也都能证明抑制细胞的重要作用。

由于已证实了抑制细胞在正常机体的特异性和非特异性免疫调节中起着积极的作用,因此在免疫治疗和积极预防工作的措施中,必须考虑如何适当地激活或抑制这类细胞的功能,为此必须对此类抑制细胞的研究情况作较全面的了解,本文的目的在于将近年来有关抑制细胞的种类、性质、功能和作用机制作简要的介绍,为临床免疫治疗和特异性免疫预防工作提供一些理论上的基础。

二、抑制细胞的种类

近年来采用多种实验方法已证实,许多种细胞都具有抑制细胞的功能如 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、巨噬细胞,最近还有人报道发现骨髓抑制细胞,但以对 T 淋巴细胞的抑制功能研究得较详细。这些抑制细胞又可根据其对于抗原的反应性,而区分作为特异性及非

特异性的抑制细胞。

三、各类抑制细胞的特性

1. 抑制性 T 淋巴细胞 (T_s)

Gershon 于 1970 年观察到在动物体内, 可通过 T 细胞的转移而被动转移特异性免疫耐受性, 因此他于 1971 年首先报道存在抑制性 T 细胞, 他描述在给动物反复注射大剂量抗原如绵羊红细胞后, 可引起对该抗原的特异耐受性, 如将此耐受性动物的淋巴细胞注射给另一正常动物, 可使此受者对该抗原的反应性被抑制。以后 Baker 等发现如切除受者的胸腺或给受者注射抗淋巴细胞免疫球蛋白后, 抗体产生的反应又可增强。现已证实, 在 T 淋巴细胞中存在有抑制性 T 细胞亚群。在小鼠的 T_s 细胞表现型均带有 $Thy-1^+$ 及 $Ly2^+$, 3^+ 抗原标记, 根据对抗原的特异性可将此 T_s 分为非特异性 T_s 及特异性 T_s 。

(1) 非特异性的 T_s 细胞 Hubert 等^[2,3,4]报道动物的脾或淋巴结细胞, 人类外周血淋巴细胞当与适量 (25—50 微克/毫升) 伴刀豆蛋白 A (ConA) 共同培养 48 小时, 即可诱导非特异性 T_s 的形成^[5,6,8]。此类抑制细胞表现的作用, 主要有抑制抗体合成, 如对绵羊红细胞、Ficoll 等抗原的 IgM 和 IgG 合成的体外空斑形成细胞反应; 抑制对同种异体抗原的增殖反应; 抑制混合淋巴细胞反应 (MLR) 中 T 细胞毒性细胞的形成。

此类非特异性 T_s 细胞有以下的特性

- 1) 存在部位: 胸腺皮质及脾脏, 称为 T_{10} 。
- 2) 对 X 射线有一定的抵抗性。但 Stanley^[8] 报道 1000rad 以上, 即可失去抑制活性, 故认为对射线敏感。一种解释是可能有不同的 T_s 亚群。
- 3) 一般能粘附在玻璃纤维和尼龙纤维柱上^[9], 但也有人报道有不粘附性的 T_s ^[7]。
- 4) 对环磷酰胺敏感。
- 5) 对丝裂霉素敏感, ConA 诱导的 T_s 细胞, 经丝裂霉素 C 处理后即失去大部分抑制活性, 说明 ConA 激活细胞需有一增殖期及分化过程, 以充分诱导出其抑制活性。
- 6) 带有组织胺受体, 故能与组织胺结合^[8]。
- 7) 在组织培养中不稳定, 经 24 小时培养后即不能查见。成人或成鼠经摘除胸腺后, T_s 即消失, 故 T_s 细胞的寿命较短。老年期个体中的 T_s 较青年期少。
- 8) 在混合淋巴细胞培养中, 刚开始时加入 ConA 激活的 T_s , 才能显示抑制活性, 如在 MLC 的末期加入 T_s 则无作用。
- 9) 有吸附辅助 T 细胞释放的 LMF (淋巴细胞有丝分裂因子) 的作用, 因而使 B 细胞合成 IgG 的功能受阻^[8]。
- 10) 释放可溶性免疫反应抑制因子。经 ConA 激活的非特异性 T_s 细胞能分泌可溶性因子于培养的上清液中, 非特异性地抑制体外抗体形成反应, 如 Rich 及 Pierce^[4] 描述小鼠脾及淋巴结中的 T_s , 能分泌出可溶性免疫反应因子 (SIRS)。

Takushi 等^[10] 1978 年用 ConA 激活小鼠脾淋巴细胞, 证明被激活的鼠脾 $Ly2^+$ 、 3^+ T 细胞产生一种可溶性产物 (SIRS), 它可通过作用于巨噬细胞而抑制体外的鼠脾细胞对绵羊红细胞发生的空斑形成反应。经 SIRS 处理过的巨噬细胞也能直接抑制 PFC 反应, 其作用机制并非抑制巨噬细胞, 而是激活巨噬细胞, 此激活过程至少须经三天才能充

分表现,即巨噬细胞的受抑仅在处理四日之后才变得明显,也就是在 DNA 合成显著地减少之后。作者进一步采用微孔小室法,将被 SIRS 处理过的巨噬细胞和鼠脾淋巴细胞隔开分别进行孵育,发现经处理过的巨噬细胞可放出一种因子,称为“第二因子”,作用于脾淋巴细胞能出现积极的抑制效果,因为使反应的 B 细胞的增殖作用受到抑制。

根据 Kapp 综述^[7],这种 SIRS 是一种糖蛋白,分子量为 48,000—67,000;巨噬细胞是它作用的靶子,但必须经孵育三日后才显出抑制效应。SIRS 的作用无种特异性,其抑制活性不能被不溶性抗原、抗鼠免疫球蛋白的抗体或抗 H-2 血清所吸收,说明此因子不含免疫球蛋白决定簇。SIRS 能抑制促有丝分裂原激活 B 细胞发生母细胞化的反应;能抑制体外的细胞对于胸腺依赖和胸腺不依赖抗原产生抗体的作用,甚至,将此因子注入小鼠体内,可导致低丙球蛋白血症,还可使 NZB/W 小鼠的自身免疫特征消失^[11]。

除此之外, Waksman 等^[9]于 1977 年提出,非特异性 Ts 是通过释放一种非特异性糖蛋白介质, DNA 综合抑制体 (IDS) 而起作用。正常 Ts 与有丝分裂原或致敏细胞与抗原在体外接触后,经数小时即可分泌出 IDS,抑制细胞 DNA 的合成。

Leonard 指出^[12],用 ConA、二硝基苯基化 (DNP) 的牛血清白蛋白 (BSA)、大肠杆菌脂多糖等作用于淋巴细胞,于第三日收集培养上清液,其中即有 IDS。不论何种刺激物作用于淋巴细胞后产生的 IDS,其作用均相似,故是非特异性的因子,几乎可抑制所有的体外反应,其机制是阻止从周围血液召集新的细胞,故可限制反应的加强,但对已在 DNA 合成时相中的细胞,则无任何抑制作用。

关于 IDS 的性质,如 Waksman 等描述^[9]分子量为 75—80,000, $PI = 3.0$,耐热至 80℃,无抗原特异性,与主要组织相容性复合体无关,不同系动物间可发生交叉反应,甚至可超越种属界限起作用。IDS 不仅可作用于淋巴细胞上,还可对其他细胞如纤维母细胞和各种瘤细胞起作用。但对淋巴细胞的作用最强,主要作用于 DNA 合成前期 (G 期),只有此时,易感细胞表面上才存在有对 IDS 的受体。

IDS 的作用机制主要是能在数秒钟内刺激细胞膜上的腺苷酸环化酶,使靶细胞内的 cAMP 升高 5 倍,比终止 DNA 合成时所需的 cAMP 的量多得多,故于数分钟内就中断了 DNA 的合成,使细胞的活性受到抑制。

根据上述资料 SIRS 与 IDS 在分子量、释放速度和作用等方面,都有着明显的不同。

人类外周血的淋巴细胞,经 ConA 激活而诱导的抑制细胞,是否也分泌出类似小鼠 SIRS 的抑制因子? Donald 等^[6,13]最近用体外试验证明,人外周血淋巴细胞系与 ConA 40 微克/毫升孵育 48 小时后,将培养物的上清液通过 Sephadex G-50 分离,结果也得到可溶性的抑制因子。此因子加至同种异体的混合淋巴细胞培养物后,可显著地抑制 MLC 反应,主要是抑制母细胞形成,但并不影响细胞的活性,因此不是毒性作用。此因子不能抑制细胞介导的淋巴细胞溶解反应 (CML)。Donald 认为此因子与小鼠的 SIRS 不同,表现在抑制作用上, SIRS 主要抑制体外抗体的合成,人类的这种因子却主要抑制 MLC 反应,但是,也可能由于在 ConA 诱导的 Ts 上清液内,包含有多种因子,它们分别影响细胞免疫和抗体产生。目前至少已知有一种抑制因子与 SIRS 不同。人类的这种抑制因子,能抑制 MLC 却不能抑制 CML 反应,提示上清液中除抑制因子外,可能还有其他辅助因子存在。至于效应细胞和产生 SIRS 的细胞是否就是同一个细胞? 这些因子作用的对象,是

一个细胞亚群还是若干不同的亚群,因此表现出不同的反应?这些问题都必须作进一步的研究。

(2) 特异性的 T_s 细胞 Tada 等 (1974) 通过动物实验,证明存在特异性 T_s , 将已接触大剂量载体抗原血蓝蛋白 (KLH) 小鼠的胸腺和脾细胞分离,转移接种于另一同系受者,再用 DNP-KLH 抗原攻击之,结果对照组表现正常的抗 DNP 反应,而试验组对 DNP 的反应却很低。如在转移接种之前,先用抗 θ 血清及补体处理转移的细胞,以破坏其中之 T 细胞。然后再注入受者,结果抑制反应的效应即被消除。另外,如在攻击时使用的抗原载体不同,也不能产生抑制效应。这些实验证明,用大剂量载体刺激动物,可产生对载体特异性的 T_s 。

Kapp 等进一步用小鼠建立了两个模式系统,即有应答的 ($H-2^{a,b,d,k}$) 和无应答的 ($H-2^{p,q,s}$) 小鼠系,用合成的多聚 L-谷氨酸-L-丙氨酸-L-酪氨酸 (GAT) 作为抗原,在初次反应中,两系小鼠均对偶联在甲基化牛血清白蛋白的 GAT 发生特异的 IgG PFC 反应。但是,在再次刺激时,只有应答品系才发生反应, GAT 对无应答品系的攻击反而使产生 IgG 的能力下降。因为当 $GAT \geq 1$ 微克,即能诱导出 GAT- T_s , 这种 T_s 存在于无应答品系的三种单型之中。

最近 Frank 等^[14]报道,给小鼠静脉注射大量 BCG (10^8), 可导致对结核菌素的无反应性,与此同时,可在脾脏发现大量的 T_s , 具有抑制对有丝分裂原或特异性抗原的体外增殖反应。Susan 等^[15]也观察到如给小鼠静脉注射大量分枝杆菌 *M. habana*, 可在前 14 天出现迟发型超敏感性,以后则表现持久的无反应性,在脾中也有能转移抑制性的 T_s 。这些现象与在瘤型麻风患者中观察到的情况类似,即患者在感染过程中,虽然带有大量抗酸杆菌,但对麻风菌素表现无反应性。

在培养物上清液中未能查出可溶性抑制因子,在超声裂解的淋巴细胞提取物中含有之。其特性为:

- 1) 是蛋白质,分子量为 30,000—60,000;
- 2) 存在于胸腺髓质及脾脏,称为 T_2 ;
- 3) 对 X 射线敏感;
- 4) 带有 Thy-1、Ly2,3⁺ 抗原表现型^[15];
- 5) 受 Ir 基因的控制,带有 Ia 抗原;
- 6) 有抗原受体;
- 7) 不具免疫球蛋白重链及轻链恒定区的决定簇;
- 8) 有由 H-2 复合物中 I 区基因编码的 Ia 抗原决定簇,有人证明是由 I-J 亚区的基因供码。这些因子的作用受动物种属间的界线所限制,如只有无应答小鼠才能产生此抑制因子,此因子又只能对同系或同种异体的无应答小鼠品系才起抑制作用。

非特异性与特异性 T 抑制细胞 (T_s) 特性的比较见表 1。

非特异性及特异性抑制因子的区别。

关于淋巴细胞上存在 Fc 受体 (FcR) 的问题,近年来许多资料已证明某些 T 细胞亚群也存在 FcR^[16,17]。Stout 等^[18]报道,外周血中 20% 的 T 细胞和 10% 的胸腺细胞上均可可见 FcR。不带有 FcR 的 T 细胞,在免疫反应中显示辅助活性,而带 Fc 受体的 T 细胞,显示抑制作用。最近对人淋巴细胞的研究^[19]指出,采用 EA 花结法,根据 T 细胞对

表 1 T 抑制细胞的特性

特 性	诱 导 物	
	ConA	GAT
对X射线的抵抗性	+	-
效应细胞 Ly 表现型	Ly1 ⁻ ,2 ⁺ ,3 ⁺	Ly1 ⁻ ,2 ⁺ ,3 ⁺
前体细胞 Ly 表现型	Ly1 ⁻ ,2 ⁺ ,3 ⁺	?
抗原特异性	-	+
抑制作用		
抗体合成	+	+
增殖反应	+	?
混合淋巴细胞反应	+	?
可溶性介质	分泌 SIRS	在细胞膜的提取物中

表 2 T 抑制因子的特性

抑制因子的特性	诱 导 物	
	ConA	GAT
抗原特异性	-	+
在产生抑制因子时的种系限制	-	+
抑制因子活性的种系限制	-	±(无反应系)
理化性质		
蛋白质	+	+
大小(分子量)	48~67,000	40~55,000
Ig 决定簇	-	-
Ia 决定簇	-	+
抗原结合活性	-	+
靶细胞	巨噬细胞	不是巨噬细胞

IgG 及 IgM 结合能力的差异,而区分为,与 IgG 结合的带 Fc γ 受体的和与 IgM 反应的带 Fc μ 受体的两个亚群。只有 Fc γ 亚群才具有抑制活性。Uytide 等^[19,20]也得到相同的结果。因此认为可根据测定 Fc γ 受体而鉴别 T 细胞中的 Ts。但 Anne Cooke 等提出了不同的意见^[21],他们改善了分离淋巴细胞为 FcR⁺ 及 FcR⁻ 两群的实验方法,减少了污染的误差,然后分别用 ConA 进行刺激,结果从两组中都诱导出了抑制对 SRBC 发生反应的非特异性 Ts,因此,似乎不论 Ts 上是否带有 FcR,都能诱导出 Ts,故与抑制活性并无密切的关系。总之,许多资料说明 FcR 在细胞上的动度较大,特别与细胞的分化过程有关^[37]。虽然还不知道在不同的 T 细胞上 FcR 如何出现和消失,但 FcR 可代表此细胞在短时期内的一种活性。FcR 可以很快地从膜上脱落,在培养液中起作用,FcR 的调控作用,目前已引起重视。

2. 抑制性 B 淋巴细胞

许多资料已证明 T 细胞的亚群,抑制性 T 细胞具有调节体液免疫及细胞免疫的功能。但根据实验观察发现 B 细胞中之抑制 B 细胞也有调节功能,如给小鼠注入 7S 的兔抗 SRBC 抗体或 IgG₁ 抗 SRBC 抗体,可抑制小鼠对 SRBC 刺激的免疫反应,用 19S 抗 SRBC 或 IgG₂ 类抗体注射小鼠,即可加强它对 SRBC 的抗体反应,说明 7S 及 19S 或 IgG₁ 及 IgG₂ 抗体在初次免疫反应中有不同的调节作用。Kinov 等证明部分来自骨髓的 B 淋巴

细胞也具有免疫调节的功能、Stout 推测 FcR^+B 细胞, 通过与抗原-抗体复合物的作用, 也可能具有非特异的抑制作用。Masuda 等^[24]用分离法将接触过 DNP-DE 或 DNP-KLH 抗原的小鼠脾细胞进行分离为 B FcR^- 及 B FcR^+ 两部分, 通过过继转移给经照射的同系受者体内, 然后取出观察对体外抗体形成的影响, 结果证明 FcR^+B 细胞及其培养物上清液, 对于 FcR^-B 细胞都有非特异性的抑制作用, 说明在培养液中有 FcR^+B 细胞释放的抑制因子, 此因子是继 B 细胞上的 Fc 受体与抗原抗体复合物结合后, 激发了抑制性信号, 诱导出一种介质抑制抗体的形成。此因子的分子量为 30,000—63,000, 其活性可被抗 H-2 血清所吸收, 不能被兔抗小鼠免疫球蛋白血清或热凝聚的免疫球蛋白所吸收, 总之, 其生理作用还不清楚。

Ruth 等^[22]用纯化蛋白抗原致敏动物, 诱发迟发型超敏, 然后用环磷酰胺处理其 T 细胞群使其失去活性, 再通过转移细胞实验, 发现在一定条件下, 特异性迟发型超敏反应受到了抑制, 就是受到其中的抑制 B 细胞作用的影响。Fusap^[23]的豚鼠试验亦证明, 对于用弗氏完全佐剂和 DNP-牛血清白蛋白诱导的迟发型超敏反应, 虽然经加入抗 T 细胞血清及补体除去豚鼠脾细胞中 Ts 的活性, 在转移给另一正常受者时, 超敏反应仍受到抑制的作用。这种抑制显然不是由 T 细胞所介导的。

关于 B 抑制细胞的特性与功能, 目前了解得还很少, 有待作进一步的探讨。

3. 巨噬细胞

巨噬细胞在体液免疫和细胞免疫中均起着重要的调节作用, 除可促进免疫反应之外, 尚有抑制反应的功能。Lucinda 等^[25]观察到, 兔淋巴结细胞作体外试验时, 在再次免疫反应中可产生大量高亲和力的 IgG 抗体。如将淋巴结细胞经玻璃珠柱分离为有粘附性与不粘附性的两部分, 再分别测定其对抗原的抗体反应。结果证明, 非粘附细胞的抗体反应较未经分离的对照细胞的效价约高 3—4 倍。如又把粘附性的细胞加入非粘附细胞抗体反应即明显地受到抑制。根据细胞特征, 这类粘附性的细胞就是巨噬细胞。它不仅能调节反应的强度, 还可调节产生抗体的质量。除去此类抑制细胞后, 在非粘附的细胞培养物中, 可出现大量抗体形成细胞和产生低亲和力的抗体。

巨噬细胞还可抑制淋巴细胞集落形成, 释放淋巴细胞集落抑制因子 (LCIF), 以腹腔巨噬细胞释放 LCIF 最多。抑制因子无种特异性。

4. 骨髓中的抑制细胞

Axel^[26]通过小鼠试验, 证明骨髓中有一群能抑制同系动物脾细胞在体外对蛋白质及红细胞抗原产生 IgM 抗体反应的细胞。是一种中等大小的淋巴细胞, 不粘连于尼龙纤维, 带有 Fc 受体, 对兔抗鼠 T 细胞血清不敏感, 抗巨噬细胞血清亦不能减低其抑制活性。此细胞对射线作用敏感, 目前认为是骨髓中的抑制细胞, 但其真正的作用还有待进一步研究。

四、抑制细胞在免疫调节中的作用

近年来的资料有力地证实了抑制细胞在免疫反应的调节中, 起着重要的作用。机体

的免疫现象较复杂,包括许多反应的因素,如下列各种免疫现象,均能证明有各种抑制细胞在其中起着积极的主要的作用,如免疫耐受性、抗原竞争现象、接触性及迟发型超敏反应的控制、基因控制的免疫反应的抑制、对胸腺依赖及非胸腺依赖抗原的抗体反应的调节以及对反应素抗体(IgE)反应的抑制作用等。自然,这些复杂现象的抑制,并非由单一的抑制机制所控制,而是由上述的不同的抑制细胞系所调节的。

1. 免疫耐受性

免疫耐受性的发生机理,尚不很清楚。存在多种假说,最近的资料提出了明确的证明,在与抗原接触而发生免疫耐受性时,抑制T细胞在其中起着主要的作用^[28]。

在动物实验中, Gershon 等通过将已建立耐受性小鼠的脾细胞,移植到另一已经照射处理的同系受者,成功地转移了耐受性,他称此现象为“传染性免疫耐受性”。但在移植之前,如先用抗 θ 血清和补体与此脾细胞作用,以除去其中的T细胞,结果就不能转移耐受性了,由此可证明Ts在其中的作用。目前发现迟发型超敏的无反应性、接触性敏感性等都包括了Ts的效应。又如在低剂量和高剂量的耐受性、对颗粒性及可溶性抗原的耐受性^[28]、对胸腺依赖及胸腺不依赖抗原如SRBC、血蓝蛋白、二硝基氟苯、苦基氯^[30]及第III型肺炎球菌脂多糖等的耐受性^[32]。虽然Ts并非免疫耐受性的唯一作用机制,有些耐受性可与Ts无关,如由不成熟B细胞也可导致耐受性,但Ts在体内对自身抗原成分产生耐受性的作用,甚为重要。

2. 抗原竞争

已知当给动物注射一种抗原或一种决定簇后,能干扰对随后注入的另一种抗原或决定簇的免疫反应,称为抗原竞争^[31,11]。这种现象是非特异的和短暂的,但包含了一个积极的免疫抑制过程。非特异性Ts在其中起着重要的作用。此时如把正常动物的淋巴细胞,注入已发生抗原竞争动物体内,这些细胞的作用,也会遭到抑制。带有进行性生长的,同系小鼠的肿瘤的小鼠^[39]和发生移植物抗宿主(GVH)反应动物,是一个很好的例子。如将这些动物的脾细胞取出,进行对有丝分裂原、同种异体抗原的体外反应,结果这些反应全受抑制。但是,如先将脾细胞中的T细胞全部除去,则可出现反应。在抗原竞争中,抗原及有丝分裂原首先激活Ts, Ts激活巨噬细胞,由巨噬细胞担当效应细胞,非特异地抑制B细胞的增殖和形成抗体^[41]。

3. 对胸腺不依赖抗原免疫反应的调节作用

Baker 等^[32]证明,给动物先注射抗 θ 或抗胸腺血清除去动物的T细胞后,再用第III型肺炎球菌脂多糖进行免疫,结果产生抗体的效价会大大升高,如果给此动物再次注入同系动物的胸腺细胞,抗体反应又可见下降,此现象表明抑制作用与呈阴性反应的Ts有密切关联。动物对多聚肌苷酸-多聚胞苷酸(PolyI:C)^[33],对聚乙烯吡咯烷酮(PVP)的反应,亦是如此。原因是其中的Ts限制了B细胞的增殖反应。

4. IgE 抗体反应的调节

大量证据证明IgE的形成,需要辅助T细胞和IgG 封闭性抗体的帮助,但是近年的

资料提出,抑制T细胞对于IgE的形成,有重要的调节作用。Tada, Okumura 等^[34,35],用二硝基苯连结蛔虫提出液(DNP-ASC)作为抗原,对大鼠进行试验,确证载体特异性Ts能中止大鼠合成IgE,即在初次免疫过程的早期,对DNP特异的IgE的形成可被载体特异的Ts所抑制,并且还可阻止发生再次抗体反应。他们已从这种特异性Ts中分离到一种因子,能特异地抑制对相同载体的IgE形成。Kishimoto及Ishizaka的实验模式^[36]证明,有许多非特异性Ts因子,也能影响IgE的形成。在许多病理的情况下,IgE水平上升,常常是由于Ts不正常而导致的后果。

5. 基因控制的特异性免疫反应的调节

已观察到由免疫反应(Ir)基因控制的许多免疫反应中,特异性Ts起着重要的调节作用。Kapp等^[7]用小鼠建立的实验模式,有力地证明了特异性Ts所起的作用。无应答小鼠经GAT聚合物免疫后,其Ts细胞只能抑制同基因小鼠脾细胞对GAT-MBSA的免疫反应,不能抑制针对其他抗原的免疫反应。如先用抗 θ 血清及补体处理此抑制细胞,其抑制活性也就消失。

6. 有丝分裂原激活的免疫抑制

很多作者均已报道了关于ConA诱导形成抑制细胞的实验资料^[2,6,8,40,41]。ConA作用要求一定的条件,必须在开始实验的48小时内加入,但在第四天才表现出抑制的效果,使DNA的合成被抑制,第五天时空斑形成细胞的数目才大量减少。ConA所诱导的主要是非特异性Ts,通过分泌SIRS或IDS而起抑制效应。例如,抑制对同种异型细胞产生细胞毒性淋巴细胞;抑制混合淋巴细胞反应;抑制有丝分裂原诱导的母细胞转化反应;抑制对多种抗原的抗体和Ig的形成。

一般认为,ConA诱导的非特异性抑制细胞和抑制因子,是目前用来研究免疫缺陷动物及人类自身免疫疾病中的Ts前体细胞是否缺乏的有力工具。

7. 同种型及独特型抑制作用

过去认为此免疫反应,主要是由双抗体的作用所介导。但Jacobson等^[42]发现,Ts在同种型抑制中,起重要作用。作者用SJL带(Ig-Ib)遗传标记的雄性小鼠与Balb/c(Ig-Ia)遗传标记的雌鼠交配,发现其子代对Ig-Ib免疫球蛋白及抗体的产生,受到抑制。经分析此子代小鼠体内,有能产生Ig-Ib抗体的前体细胞,但这些细胞的成熟和抗体分泌过程受到抑制。实验证明,当把这些细胞过继转移给另一曾受致死剂量射线照射的Balb/c非Ig-Ib小鼠体内,则可观察到突然的大量产生Ig-Ib免疫球蛋白。说明这些转移细胞,在供者体内受到抑制,如先用抗 θ 血清或切除胸腺以除去供者体内的T细胞,抑制作用也就消除,故推测这种抑制细胞是T细胞。Ts通过阻止正常的带Ig-Ib的B细胞,发育成熟为能够合成这种同种型Ig的细胞,因而对这种同种型的反应起调节作用^[41]。

关于对独特型的抑制作用,Eichmann^[43]描述,也是由于抑制T细胞的效应,与上述同种型抑制类似。小鼠经抗独特型抗体处理后,则失去对特异性独特型抗体合成的反应。如A/J小鼠被A族链球菌免疫后,可产生带有独特型决定簇(A5A)的抗体。豚鼠抗A5A的IgG₂抗体,具有抑制被链球菌免疫的A/J小鼠表现A5A独特型的能力,此

抑制能力与注入抗体的剂量多少有关,大剂量抗独特型抗体,引起迅速而短期的抑制,小剂量可导致缓慢而长期的抑制效应。如将此被抑制小鼠的脾细胞,转移给另一经照射处理的小鼠,这种慢性抑制效应也可被动转移。同样,这种抑制细胞也被证明是 T 细胞,可粘附在复盖有组织胺的琼脂糖珠 2B 柱上。

这种能识别表现在 B 细胞或其他 T 细胞表面上的成分的 T_s , 在免疫反应的调节作用中,可能是非常重要的。

根据上述资料可以看到, T 抑制细胞对于免疫反应的每一个时相,都能发生影响,起着机体不可缺少的调节作用。

免疫反应是机体的重要防御机能,免疫反应强弱的调节,是一重要而复杂的生理现象。抑制细胞在其中的阴性调节,是必不可少的因素之一。抑制细胞的存在数量和活性强弱必须适度,否则均会导致病理的及不正常的后果。

五、关于抑制细胞产生抑制效应的机制问题

虽然近年来已积累了大量的实验资料,但还不能清楚地阐明抑制细胞及其分泌因子的抑制作用机制。总括有三种作用方式,就是抑制细胞直接作用于另一靶细胞;分泌的抑制因子作用于靶细胞;分泌的抑制因子与其他可溶性辅助因子相互作用等。

关于 T_s 的作用靶子是辅助 T 细胞的证据较不一致, Tada 等根据用 DNP-ASC 抗原免疫小鼠的实验证据,认为 T_s 对胸腺不依赖抗体反应抑制作用的靶子,是载体特异性辅助 T 细胞^[41](T_H),他认为抗原进入机体后,首先刺激 T_H 细胞,此被激活的 T_H ,除活化相应的 B 细胞使其分化增殖以外,又同时诱导特异性 T_s 出现, T_s 出现后即反过来作用于 T_H ,抑制其活性。Eardley 等^[44]证明这种 T_s 细胞带 $Ly1^+$, 2^+ , 3^+ $Qa1^+$ 表型。Canter 等^[42]认为这种作用方式,在自身稳定的免疫调节中很重要。

最近证明 T_s 还可进一步分为不同的亚群,起着调节抑制反应的作用,如 Tada^[46]发现,带有 I-J 决定簇的特异性 T_s ,可分为两个亚群:一群是 $Ly2^+$, 3^+ ,产生抑制因子;另一群 T_s 有 $Thy1^+$,及 $Ly1$, 2 , 3 ,表现型,带有对抑制因子的受体,前者可作用于后一群细胞,通过抑制因子与受体的互补作用,使后一群细胞转变成真正的抑制细胞,因此 T 细胞抑制因子可能通过第三型细胞来抑制抗体形成。

T_s 的作用靶子可以是巨噬细胞,这方面的报道也较多,如最近 Roy 等^[27]通过用 ConA 刺激豚鼠淋巴细胞,和人外周血被特异性抗原刺激后的效应的观察,证明作用靶子为巨噬细胞,和 Zembala 等的动物实验结论一致。

T_s 的作用靶子还可能是 B 细胞,曾报道由 ConA 诱导的带 H-2, I-J 区抗原特征的 T_s ,可直接干扰 B 细胞的活性^[47]。Baker 提出 T_s 可能作用于 B 细胞表面的独特型决定簇上。

抑制因子作用于靶细胞而起抑制作用,主要表现在非特异性 T_s 分泌的 SIRS 及 IDS,其作用的靶细胞已证明是巨噬细胞^[7,9,10]。

总之,目前尚未建立一个能清楚地阐明此复杂的抑制细胞调控作用的实验模式。

根据已有的这些资料,已能给免疫预防工作和临床诊断治疗免疫性疾病等方面,提供指导性的建议。

例如在防疫工作中,为了加强预防接种的免疫效果,在采用多种菌(疫)苗及制订接种计划时,应考虑避免出现抗原竞争等抑制作用,必需选用适当的配方和免疫程序。

对临床各种免疫性疾病,在诊断治疗时,应根据机体的情况,纠正其免疫调节功能,如在肿瘤患者、IgA 缺乏症、低丙种球蛋白血症等,其抑制细胞的功能往往偏高,则应适当地控制 Ts 的活性;又如在许多自身免疫性疾病中(全身性红斑狼疮、IgE 抗体反应)常由于抑制细胞功能低下,此种情况则应刺激抑制细胞以增强其活性。通过对 NZB/W 小鼠注射 SIRS,达到了防止其自身免疫继续发展的实验^[48],给治疗人类类似的自身免疫疾病工作,提供了希望。但是还是以寻找一种能直接激活抑制细胞的抗原或佐剂,以适当地使免疫调节系统回复到正常生理平衡状态则更为理想,即所谓免疫工程。Ishizaka 等^[49]曾用豕草亚单位抗原 E 进行试验,证明此种抗原能不刺激 IgE 的产生也不能与 IgE 抗体发生反应,其作用只能刺激 T 细胞,此效应提示,激活特异性 Ts,可能有效地达到脱敏感性的效果。

随着各方面研究工作的深入进展,不久的将来,这些对于抑制细胞在免疫调节中的生理作用,以及在自身免疫病和免疫缺陷时,抑制细胞紊乱的病因学研究,将给人类带来更为有效的预防和治疗免疫性疾病的方案和措施。

参 考 文 献

- [1] Gershon, R. K., *Immunology*, 1971, 21, 903.
- [2] Hubert, C. et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 1976, 26, 95.
- [3] Carole, G., *Cell. Immunol.*, 1977, 34, 376.
- [4] Rich, R. R. et al., *J. Immunol.*, 1974, 112, 1360.
- [5] Shou, L., *J. Exp. Med.*, 1976, 143, 1100.
- [6] Gary, B. et al., *Cell Immunol.*, 1978, 40, 16.
- [7] Kapp, J. A. et al., *Fed. Proc.*, 1978, 37, 2361.
- [8] Stanley, M. et al., *Cell Immunol.*, 1979, 45, 120.
- [9] Waksman, B. H., *Clin. Exp. Immunol.*, 1977, 28, 363.
- [10] Tadakuma, T., *J. Immunol.*, 1978, 120, 481.
- [11] Waldmann, T. A. et al., *Prog. Clin. Immunol.*, 1977, 3, 155.
- [12] Leonard, S. E., *Cell Immunol.*, 1978, 37, 349.
- [13] Donald, B. et al., *Cell Immunol.*, 1979, 47, 153.
- [14] Frank, M., *Infect. Immunity*, 1979, 25, 491.
- [15] Cantor, H. et al., *J. Exp. Med.*, 1976, 143, 1391.
- [16] Miyama, M. et al., *Cell Immunol.*, 1978, 35, 253.
- [17] Yodoi, J., *Cell Immunol.*, 1978, 39, 225.
- [18] Stout, R. D. et al., *J. Exp. Med.*, 1975, 142, 611.
- [19] Cobi, J. H. et al., *Cell Immunol.*, 1979, 43, 282.
- [20] Uytide, H. F., *Nature (London)*, 1978, 271, 556.
- [21] Cooke, A., *Cell. Immunol.*, 1979, 47, 90.
- [22] Ruth, N. et al., *J. Immunol.*, 1974, 113, 1716.
- [23] Fusap, O. et al., *Cell Immunol.*, 1979, 43, 263.
- [24] Masuda, T. et al., *Cell Immunol.*, 1978, 39, 238.
- [25] Lucinda, H. E. et al., *Cell Immunol.*, 1978, 40, 46.
- [26] Axel, K. et al., *Cell Immunol.*, 1979, 43, 362.
- [27] Roy, A. et al., *Cell Immunol.*, 1979, 47, 69.
- [28] Kuroiwa, A., *Cell Immunol.*, 1979, 47, 79.
- [29] Chaouat, G. et al., *Cell Immunol.*, 1978, 36, 1.
- [30] Thomas, W. R., *Immunology*, 1979, 36(4), 843.
- [31] Malcolm, S., *Med. Immunol.*, 1977, 90.
- [32] Baker, P. J. et al., *J. Immunol.*, 1974, 112, 2020.

- [33] Clarice, K., *Cell Immunol.*, 1978, **39**, 345.
- [34] Tada, T. et al., *Prog. Allergy*, 1975, **19**, 122.
- [35] Okumura, K. et al., *J. Immunol.*, 1971, **106**, 1019.
- [36] Kishimoto, T. et al., *J. Immunol.*, 1974, **112**, 1685.
- [37] Yodoi, J. et al., *Cell Immunol.*, 1978, **35**, 266.
- [38] Axel, K. et al., *Cell Immunol.*, 1979, **43**, 372.
- [39] Hanna, N. et al., *Cell. Immunol.*, 1979, **43**, 293.
- [40] Perlman, P., *Science*, 1970, **168**, 1112.
- [41] Kuritani, T., *Microbiol. Immunol.*, 1979, **23**(2), 185.
- [42] Jacobson, E. R. et al., *J. Exp. Med.*, 1972, **135**, 1151.
- [43] Eichmann, K., *Eur. J. Immunol.*, 1974, **4**, 296.
- [44] Eardley, D. D., *J. Exp. Med.*, 1978, **147**, 1106.
- [45] Cantor, H. et al., *J. Exp. Med.*, 1978, **148**, 871.
- [46] Tada, T. et al., *Ir Genes and Ia Antigens*, 1978, 517.
- [47] Daniele, P., *Cell Immunol.*, 1979, **47**, 143.
- [48] Krakauer, R., *Science*, 1977, **196**, 56.
- [49] Ishizaka, K., *J. Immunol.*, 1974, **113**, 70.
- [50] Nicholas, R. et al., *Pharmacol. Therap.*, 1979, **4**, 355.

巨噬细胞及其功能

南国华 黄文长

(江西医学院)

一、巨噬细胞的结构特征

1. 细胞膜
2. 溶酶体
3. 微丝与微管

二、巨噬细胞的种类

1. 来源与种类
2. 成熟过程功能的演变
3. 不同种类的功能差异

三、巨噬细胞的功能

1. 吞噬
2. 抗癌作用
3. 参与免疫应答

四、巨噬细胞的激活与抑制

1. 激活

2. 抑制

五、巨噬细胞分泌的可溶性活性物质

1. 淋巴细胞激活因子 (LAF)
2. 遗传相关巨噬细胞因子 (GRF) 和非特异巨噬细胞因子 (NMF)
3. 绵羊红细胞溶解因子
4. 识别因子 (RF)
5. 干扰素 (If)
6. 前列腺素 E(PGE)
7. 肿瘤坏死因子 (TNF)
8. 几种跟炎症相关的酶

巨噬细胞是一类参与免疫反应的细胞，在调节淋巴细胞功能和免疫应答上的重要性已为人们所重视。巨噬细胞属于单核吞噬细胞系统。这一系统的建立是从 19 世纪开始，几经修改而来的。最初为 1892 年 Metchnikoff^[1] 将有吞噬作用的细胞称为吞噬细胞，包括体积较小的多形核中性粒细胞和体积较大的单核吞噬细胞两大类。因后者的吞噬力强，Metchnikoff 又将其命名为“巨噬细胞系统”，以区别体积较小的粒细胞。1924 年，Aschoff^[2] 把具有吞噬功能并来自网状组织的细胞统称为“网状内皮系统”。至七十年代初期，因感到“网状内皮系统”一词，无论在细胞种类及功能上均不确切，因而由 Van Furth^[1,2] 等把形态、功能、来源及细胞动力学等相似的，具有吞噬功能的细胞叫做“单核吞噬细胞系

表 1 网状内皮系统与单核吞噬细胞系统

网状内皮系统	内皮细胞 纤维细胞 脾及淋巴结网状内皮细胞(包括枯否氏细胞) 组织细胞 脾细胞和单核细胞
单核吞噬细胞系统	骨髓中前身细胞 前单核细胞 单核细胞 巨噬细胞(包括组织细胞、枯否氏细胞、肺泡巨噬细胞、脾巨噬细胞、骨髓巨噬细胞、胸腔及腹腔巨噬细胞等)

统”,其所涉及的细胞见表1。

巨噬细胞在免疫学上的作用,认识亦较早。1863年 Von Recklinghausen^[3]观察到炎症部位有阿米巴样单核细胞存在。继后, Metchnikoff^[2]以细菌注入低等动物体的实验证明,该细菌被阿米巴样细胞所消化,从而便有了吞噬细胞对机体的防御学说。迄今,巨噬细胞在协同T、B淋巴细胞参与免疫反应以及在抗感染、抗肿瘤等方面已积累有大量资料,为机体免疫机制和疾病防治的研究开辟了新途径。

一、巨噬细胞的结构特征

巨噬细胞是单核细胞发育成熟的阶段,两者在形态上有些不同,成熟后体积较大,人类巨噬细胞可达20—80微米。不同组织(如肺泡、腹腔及肝等)的巨噬细胞有其形态的差异。一般而言,组织巨噬细胞的染色涂片于光学显微镜下可见圆形或锯齿形的核,染色质较浓缩,但不如淋巴细胞密集,胞浆稍嗜酸或稍嗜碱性,特殊染色可见有线粒体、高尔基装置和中心体等。腹腔渗出液涂片染色,结果亦一致。

巨噬细胞可粘附于玻璃表面,扩散成单层时,于相差显微镜下,细胞表面显示有缓慢而持续起伏的褶皱,能伸展伪足。

在电镜下,不仅能看见上述结构,而且能更精细地观察到细胞膜、细胞核、线粒体、内质网、溶酶体、微丝、微管、吞噬体及其他致密颗粒等亚细胞结构成分。巨噬细胞的形态按所处环境(如培养时间及培养条件)和机体的生理病理状况不同而有变动。电镜扫描下,可见腹腔巨噬细胞因刺激条件不同,形态有很大差异。脂质刺激巨噬细胞,细胞膜表面起皱更为突出,这可能与吞噬能力增强有关^[4-6]。

巨噬细胞的亚细胞成分与免疫学功能有着密切联系。

1. 细胞膜

巨噬细胞的吞噬作用、异物识别、捕获抗原等重要功能,主要是通过表面膜的活性作用。外观上,巨噬细胞膜无定形,富有突起皱褶,伸展伪足能移行。化学结构类似一般生物膜,由双层脂质与蛋白质镶嵌而成。膜表面具有多种受体、载体和特异抗原等。1972年 Rabinovitch 等指出^[7],巨噬细胞膜表面有Fc受体,对胰蛋白酶或其他蛋白酶,以及神经氨酸酶(Neuraminidase)均稳定,但粗制磷脂酶可使之非特异地灭活。1969年 Lay 等^[8]提出膜表面存在C₃受体,并认为巨噬细胞与红细胞-抗体-补体复合物的结合是通过C₃受体的。1978年胡世真等报道^[9]巨噬细胞膜表面存在 α FP(甲胎蛋白)受体,提示巨噬细胞与肝癌的密切联系。

另一类非特异受体是结合某些质粒的,如胶乳粒、蛋白集合物、醛处理过的红细胞以及血蓝蛋白(Hemocyanin)等。此外,巨噬细胞尚可能有与植物外源凝集素(plant lectins)和移动抑制因子(MIF)等结合的受体,均系糖蛋白。前者分子中的特异糖残基与植物外源凝集素结合,半抗原糖类可抑制其结合。后者与MIF的结合可被胰蛋白酶或 α -岩藻糖酶(α -fucosidase)阻止,而岩藻糖(α -fucose)能解阻。

近来,细胞融合实验还证实^[10],膜表面某些受体可因生理功能的需要而随意移动,如当巨噬细胞与裹有抗体的红细胞结合时,FC受体则随意分布和集聚,在巨噬细胞与红细

胞之间形成多架桥。于吞噬作用进行时膜 ATP 酶、转运载体及磷脂亦可按一定方向移动或集聚。

2. 溶酶体

为圆形小泡,是具有特殊功能的细胞器。各种巨噬细胞均含一定数量,有高度内吞作用(endocytosis)的巨噬细胞,含量较丰富,细胞所处环境因素对溶酶体的形成有很大影响,于高浓度小牛血清(50%)培养基中能迅速广泛地形成溶酶体,于低浓度血清培养基中,则仅能极少量形成或不能形成。溶酶体外层覆盖质膜,内含多种酶类,为巨噬细胞杀菌所需物质,使吞噬的细菌等物质消化瓦解。

溶酶体的酶类为由巨噬细胞的内质网合成,经高尔基体加工处理,包裹质膜,形成初级溶酶体。巨噬细胞吞噬异物时,浆膜包围异物,形成吞噬小体,与溶酶体融合成次级溶酶体,即含酶类和要被消化的异物。

3. 微丝与微管

巨噬细胞胞浆中的微丝、微管呈线形排列,位于细胞核、高尔基装置以及线粒体的周围。微丝由肌动蛋白和肌球蛋白构成,而微管为由管蛋白构成,二者均系与运动有关的蛋白质。

巨噬细胞进行吞噬时,异物颗粒的入胞和出胞所涉及的膜表面行为并非仅用生物膜的流动性能解释,而是受微丝、微管的调节。微丝可以收缩,使细胞膜产生运动,微管与膜的定向运动相关。1973年 Reaven 等指出^[10,11],巨噬细胞行使吞噬功能时,微丝及微管集合,同年 Goldstein 等证明^[10],多形核白细胞的补体因子(特别是 C_{5b})可使集合的微管增生,微管聚集则能影响膜成分的运动。1975年 Oliver 指出^[12],因微管调节表面膜蛋白定向运动,故微管的解聚,便导致膜蛋白随意运动。Oliver 等还认为 cGMP 可刺激微管集合,以调节巨噬细胞的表面活动。cGMP 对微管集合的影响,可能是一种间接作用,因膜运动有赖于磷酸化反应,催化该反应的蛋白激酶需要 cGMP^[13]。

二、巨噬细胞的种类

1. 来源与种类

各种巨噬细胞均来源于骨髓中的同一前身——骨髓单核母细胞(Monoblast),但在形态上可认的前身细胞是前大单核细胞(Promonocyte),后者分化增殖为单核细胞(Monocyte),于循环血中可存活数日,此种未完全成熟的细胞通过毛细血管壁,游出血液,进入组织,再进一步分化成熟为巨噬细胞,并在组织中有较长的存活力,可达数月之久,巨噬细胞按其所处部位不同,又分多种亚类^[2,5,14]:

肝——枯否氏细胞(Kupffer's cell)

肺——肺泡巨噬细胞

脾——游离的和固定的巨噬细胞

结缔组织——组织细胞

浆膜腔——胸膜腔及腹膜腔巨噬细胞

神经系统——小胶质细胞

骨髓——破骨细胞

巨噬细胞在组织中,最后可转化成类上皮细胞或巨大的多核细胞(Multinucleate Cell),此为巨噬细胞成熟的最后阶段。

2. 成熟过程功能的演变

从骨髓单核母细胞到巨噬细胞的成熟过程,伴随着细胞成分、代谢及功能的变化。

(1) 单核母细胞 有活泼的 DNA 合成及有丝分裂,增殖力很强;但吞噬力、玻璃粘附力以及免疫功能等均较弱,胞浆内重要细胞器如溶酶体含量较少。

(2) 单核细胞 血中单核细胞是巨噬细胞发育过程的一种过渡细胞。其 DNA 合成及细胞增殖力下降;亚细胞成分(溶酶体、膜受体等)渐趋丰富,吞噬力、玻璃粘附力与淋巴细胞反应均相应提高,已显示有免疫学功能的特征,具有趋化、杀菌及抗癌的能力。

(3) 巨噬细胞 单核细胞进入组织后,逐渐成熟,体积增大,胞浆丰富,溶酶体中酶类增多,线粒体中细胞色素氧化酶及细胞呼吸率提高,因结构成分的完善,使其免疫学功能明显地增强。

3. 不同种类的功能差异

(1) 肺泡巨噬细胞与腹腔巨噬细胞 巨噬细胞表面膜上具有嗜细胞抗体的 FC 受体。两种巨噬细胞间的 FC 受体对免疫复合物的亲和力彼此不同。正常(未诱导)腹腔巨噬细胞对致敏红细胞的亲和力较正常肺泡巨噬细胞者约大三倍。其原因可能与细胞成熟程度有关。因肺泡巨噬细胞包括血中单核细胞与肺中成熟的巨噬细胞,因此,细胞成熟的比例较低。不同种的巨噬细胞具有各自的特异抗原,以鼠肺泡巨噬细胞和腹腔巨噬细胞免疫家兔,可获得不同的特异抗血清^[15]。

两种细胞对趋化剂刺激的应答亦不同。家兔肺泡巨噬细胞对使腹腔巨噬细胞趋化的试剂均无应答。MIF 对腹腔巨噬细胞有抑制移动反应,而对肺泡巨噬细胞则否,因后者可能缺乏 MIF 受体。

两种巨噬细胞虽都含有较高的溶酶体酶,但肺泡巨噬细胞的杀菌活力不及腹腔巨噬细胞。有人认为^[15]杀菌力的强弱与细胞发放溶酶体酶入吞噬体内有关,而不在于酶含量的多少。

表 2 肺泡巨噬细胞与腹腔巨噬细胞活性^[15]

活 性	肺泡巨噬细胞	腹腔巨噬细胞
趋化反应	-	+
对 MIF 的应答	+(?)	+
Fc 受体活性	+	+++
食入抗原的免疫原性	-	+
免疫原性 RNA 的形成	-	+
杀菌力	+	+++

(2) 肝枯否氏细胞与脾巨噬细胞 已经明确,脾及腹腔巨噬细胞可以参与免疫诱导,而枯否氏细胞尚未肯定。1962 年 Franzl^[15,16] 的较早研究为将接受过羊红细胞的小鼠再次注入抗原后,观察其肝、脾亚细胞(溶酶体)部分诱导的第二溶血素应答,发现脾的亚

细胞部分具有阳性反应,而肝则否。1969年 Inchley 等^[15,17]也曾发现肝中枯否氏细胞不能代替脾中巨噬细胞的功能,说明这类固定于组织中的肝、脾巨噬细胞在功能上有差异。肝、脾巨噬细胞来源是同一种前体细胞,为什么功能表达不同?1970年 Howard^[15]认为局部环境因素对细胞成熟过程的影响,能使功能上产生差异。

1965年 Uhr 等^[18]曾报道家兔及豚鼠肝细胞能迅速摄取抗原以及溶酶体能局限抗原,但小鼠则相反,提示巨噬细胞功能性质不仅有组织差异、还有种族差异。

(3) 抑制巨噬细胞 近年来发现巨噬细胞具有抑制免疫反应的功能,因而又有“抑制巨噬细胞”之称。1975年 Opitz 指出^[19]腹腔巨噬细胞经体外温育后的上清液中含有一种因子,能够抑制 ³H-胸腺嘧啶核苷参入由 PHA 刺激的淋巴细胞。有的报道指出^[20]肿瘤宿主体内出现“抑制巨噬细胞”,肿瘤患者机体免疫监视的下降,似与“抑制细胞”出现相关。总之,抑制巨噬细胞已被引起很大重视。

三、巨噬细胞的功能

1. 吞噬

吞噬作用是描述细胞对颗粒物质的摄取与消化过程。一般包括趋化、接触和食入三个阶段。

(1) 趋化 1905年 Metchnikoff^[3]首先观察到白细胞可移动到炎症部位。1946年 McCutcheon^[21]把环境物质介导细胞定向移动的反应叫做趋化,也就是说,巨噬细胞向炎症或异物区的定向移动,必须由某些化学物质诱导。1968年 Shin 等^[22]报道补体第五成分片段产物(——C_{5a})是巨噬细胞的特异趋化因子,为由内毒素、抗原-抗体复合物、眼镜蛇毒液(Cobra Venom)等激活 C₅,断裂分子而成,系一种多肽,能吸引吞噬细胞。

至于趋化因子(C_{5a})如何作用于巨噬细胞,且使巨噬细胞定向运动的问题,已由 Nelson 总结为^[23]:巨噬细胞趋化反应的起动,就象肌肉感受细胞的收缩原理,不过,巨噬细胞趋化并不是起于神经冲动,而是化学趋化素(Chemoattractants)和巨噬细胞膜的接触所引起的。巨噬细胞膜表面没有趋化受体,趋化素对巨噬细胞的靠拢是由于理化性质所致,即膜间的疏水反应,因趋化素分子的非极性基(如 Tosyl 或 butyryl groups)能吸引巨噬细胞,这种非极性键能穿入巨噬细胞膜的双层磷脂,从而增加细胞膜的离子渗透性,二价阳离子(Ca⁺⁺)流入胞浆,调节细胞运动器——微丝的收缩与舒张,引起巨噬细胞的移动。微管专门调节定向运动,微管蛋白解聚,细胞虽可运动,但失去定向。

(2) 接触 巨噬细胞移向异物或炎症区后,先与颗粒接触,继而食入。巨噬细胞怎样识别异物而与之结合的机制尚未完全了解。一般认为,与异物颗粒性质和特异抗体(游离抗体或嗜细胞抗体)有关。例如^[24]:巨噬细胞对多数细菌的识别,是通过包裹在细胞表面的 IgG,因为 IgG 分子的 Fc 段可结合巨噬细胞表面的 Fc 受体;对机体产生的异常细胞(如肿瘤细胞)的识别,也是通过特异嗜细胞抗体的,而对支原体(Mycoplasma)、惰性颗粒及衰老红细胞等的识别,则可能不需特异抗体。

补体在吞噬作用中的功能尚未完全肯定,现有几种看法,一是识别作用,二是仅为辅助识别作用,或者无作用。因为已经证实巨噬细胞表面存在着补体受体,所以也可能补体在接触阶段的作用是:先与抗体-异物(抗原)复合物结合后,再与巨噬细胞表面特异受体

结合,亦即补体在接触阶段,对巨噬细胞与颗粒的结合有关。

(3) 食入 巨噬细胞表面与颗粒接触后,膜内陷,包围颗粒,并由微丝网及微管介导与邻近溶酶体靠拢,融合,被溶酶体酶消化分解。

巨噬细胞在食入前后,显示有明显的代谢变化。在食入阶段,巨噬细胞的氧耗量增加,是一种需氧耗能的过程,并可被代谢抑制剂(如 Sulphydryl poison)抑制;但代谢抑制剂却不抑制接触阶段,说明接触未必需要消耗大量的能。不同类的巨噬细胞,能量代谢方式不同,如肺泡巨噬细胞适应有氧产能过程(氧化磷酸化产能),而腹腔巨噬细胞是依赖无氧糖酵解产能的,所以,肺泡巨噬细胞的吞噬作用可因缺氧而受抑,而腹腔巨噬细胞在缺氧条件下尚能进行吞噬功能。

胞饮现象(Pinocytosis)是指细胞对液体的摄取,其过程与吞噬作用大抵相仿。胞饮形成的囊泡叫胞饮体(Pinosome)。巨噬细胞不易摄取可溶性抗原,但细胞表面能结合抗原,加以浓缩,增强抗原的免疫原性。

2. 抗癌作用

巨噬细胞在抗癌中的作用业已肯定。其对肿瘤细胞杀伤的方式有:吞噬、抑制癌细胞生长以及细胞溶解等。

巨噬细胞对癌细胞的吞噬,可见于对动物体的肿瘤,而对人体肿瘤细胞的吞噬迄今尚少见,特别是对进行性生长的肿瘤,吞噬力更为减低,这也许是机体对肿瘤免疫监视功能下降所致。卡介苗、小棒状杆菌、脂多糖和中药等^[25]常可提高机体巨噬细胞数量和吞噬力。巨噬细胞对癌细胞的吞噬,需要有特异抗体的参与。

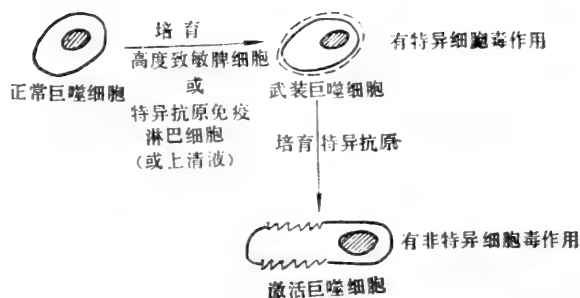
非特异激活的巨噬细胞,虽然没有特异抗体存在,但对癌细胞的生长有抑制作用。该作用既非吞噬癌细胞,也非溶解癌细胞,仅是抑制癌细胞的生长。体外培养的癌细胞,在非特异激活的巨噬细胞存在时,肿瘤细胞生长抑制,而缺乏激活巨噬细胞时,幸存的癌细胞还可重新增生。

巨噬细胞抗癌的另一重要作用是溶解癌细胞,目前对其机制的认识有:(i). 巨噬细胞依赖表面嗜细胞抗体,识别特异靶细胞,并与之接触,将溶酶体酶或细胞毒输入癌细胞,使癌细胞溶解;(ii). 巨噬细胞与淋巴细胞协同产生特异巨噬细胞武装因子(Specific Macrophage Arming Factor, SMAF),即淋巴细胞与特异抗原作用,产生的 SMAF 使巨噬细胞武装起来,武装后的巨噬细胞对靶细胞有特异细胞毒作用,将癌细胞溶解。如果武装的巨噬细胞再与特异抗原作用时,则不仅对特异靶细胞有细胞毒作用,对其他细胞亦有非特异的细胞毒作用。1972年 Evans 等^[26]将巨噬细胞的武装过程描述如下页图。

有报道^[27]曾在巨噬细胞与癌细胞培养液中分离出特异细胞毒素。后来也有未获得满意结果者^[28]。巨噬细胞对肿瘤细胞的溶解机制,迄今虽有争论,但一般仍倾向于巨噬细胞产生细胞毒的作用;(3) 巨噬细胞产生的一些可溶性分子,如识别因子、肿瘤细胞杀伤因子等,对癌细胞直接或间接起杀伤作用。

3. 参与免疫应答

加工处理抗原,以适应活化淋巴细胞的需要。巨噬细胞对抗原的处理有食入、处理及传递三步骤。巨噬细胞怎样与抗原结合的机制尚不够清楚。颗粒性抗原可能通过巨噬细



胞表面粘多糖的粘附或嗜细胞抗体与之结合。结合的抗原约 90% 被巨噬细胞食入,在吞噬体内分解为氨基酸或低聚多肽 (Oligopeptides), 失去抗原性;少数抗原 (10% 以下) 免于分解,与巨噬细胞的 RNA 结合,较长时间留存于膜表面,且抗原性显示增强。抗原性增强的原因有人认为是抗原与 RNA 结合为复合体。最后,巨噬细胞将处理的抗原传递给淋巴细胞^[24]。

参与淋巴细胞的活化作用,如有丝分裂因子作用下淋巴细胞的转化需要巨噬细胞参与,否则不发生转化或转化率降低。此外,巨噬细胞产生的可溶性因子 (如淋巴细胞激活因子)可激活淋巴细胞。反之,激活的淋巴细胞又可加强巨噬细胞功能,二者有互为因果的作用。

巨噬细胞在免疫应答方面的活性见表 3^[29]:

表 3 巨噬细胞免疫应答活性

体内	<p>颗粒或不溶物、抗原-抗体复合物等的吞噬</p> <p>抗原的摄取、局限与处理</p> <p>抗原与颗粒的分解</p> <p>形成及分泌如下因子: 免疫调节物、酶、血浆蛋白溶酶原活化剂 (plasminogen activator)、激肽、干扰素等。</p> <p>杀菌、抑菌</p>
体外	<p>吞噬颗粒和抗原-抗体复合物</p> <p>摄取及消化抗原</p> <p>非特异细胞毒</p> <p>杀菌、抑菌、抗癌</p> <p>特异抗体“武装”细胞毒、激肽形成和释放(包括细胞抑制剂和激活剂)</p> <p>对其他细胞特别是淋巴细胞的“饲养”活性</p> <p>酶释放(包括胶原酶、溶酶体酶、核酸酶等)</p>

四、巨噬细胞的激活与抑制

巨噬细胞激活的概念至今尚无明确定义。最初是 1905 年 Metchnikoff^[30] 指出某些因素增强巨噬细胞抗菌能力之前,在功能上要进行一系列的改变。直到六十年代才有人推荐引用“激活巨噬细胞”的名称,其含义是指巨噬细胞增加抗菌力时,在形态及功能上发生的较大改变,如吞噬作用、浆膜皱褶、吞噬体和内食泡 (endocyte vesicles) 的数量、粘附力

以及扩散力等均明显增强。这个所谓“激活巨噬细胞”名称已沿用至今。但随着科学的发展,现代文献中对此名称的含义便不单限于抗菌力增加方面,而已逐渐扩大,例如抗癌力、趋化反应、可溶性活性物(包括酶类)的分泌、免疫力及代谢过程(如葡萄糖胺参入率)等的加强都被成为巨噬细胞激活的指标,可见,巨噬细胞激活的概念更为广泛了。为避免混乱,1978年 North^[30] 主张从诱导激活的因素上,去划分激活的巨噬细胞,如炎症介导的激活巨噬细胞、T或B淋巴细胞诱导激活的巨噬细胞,以及淋巴激活素(Lymphokine)介导的激活巨噬细胞等等。同年, Karnovsky^[31] 等则又强调生化角度的指标,认为激活巨噬细胞的生化改变是明显的,从生化测定来衡量巨噬细胞激活状况比从功能测定(吞噬功能或灭菌功能等)更为方便。总之,这一名称的概念尚待明确,在未定论前,使用“巨噬细胞激活”之称还有其实用意义。

1. 激活

(1) 巨噬细胞激活剂 现已知有大量物质可使巨噬细胞激活,分特异性和非特异性二类(见表4)。通过不同作用机制均能提高吞噬力和消化力,增强杀菌、抗癌的效能。

特异性抗原类物质免疫机体后,可以启动体内的免疫系统,产生免疫球蛋白和激活补体 C₃, 免疫球蛋白和补体 C₃ 分别与巨噬细胞表面 Fc 受体或 C₃ 受体相结合,促进巨噬细胞对细菌、原虫和病毒的吞噬作用。巨噬细胞膜表面的嗜细胞抗体,则有利于对靶细胞的杀伤。

表 4 巨噬细胞激活剂与抑制剂^[25,29]

	激 活 剂	抑 制 剂
特 异	特异性抗原 疫苗、菌苗 特异性嗜细胞抗体 抗原抗体复合物	特异抗血清
非特异	非抗原颗粒 微生物提取物(细菌细胞壁、 脂多糖如灵菌素) 多聚核苷酸(polyI:C; polyA:U 等) 刺激性油类 干扰素诱导剂 左旋咪唑 体液性因子(胸腺素等) T细胞产物(淋巴因子等) 中药(人参、党参、刺五加、黄 芪、灵芝、肉桂、仙茅、玄参……等)	放射线、某些细菌产物 过量皮质激素 某些代谢质 胶体钆 砷

非抗原颗粒或玻璃表面为使巨噬细胞的溶酶体活力和一般代谢活力增加。刺激性油类、葡聚糖及蛋白胨等类物亦可使代谢及生物活力较低的腹腔巨噬细胞显示更大的活力。微生物提取物(如内毒素)及某些多聚核苷酸等能非特异的影响巨噬细胞与微生物(或癌细胞)的接触,以及抑制微生物或癌细胞。体液性因子(胸腺素)增加前T细胞环磷酸腺苷的合成,促进前T细胞分化为T细胞。淋巴因子(如趋化因子、移动抑制因子等)则促使巨噬细胞发挥效能^[29]。中药作用更较复杂,有的是增加巨噬细胞数量和吞噬力(党参、黄芪、

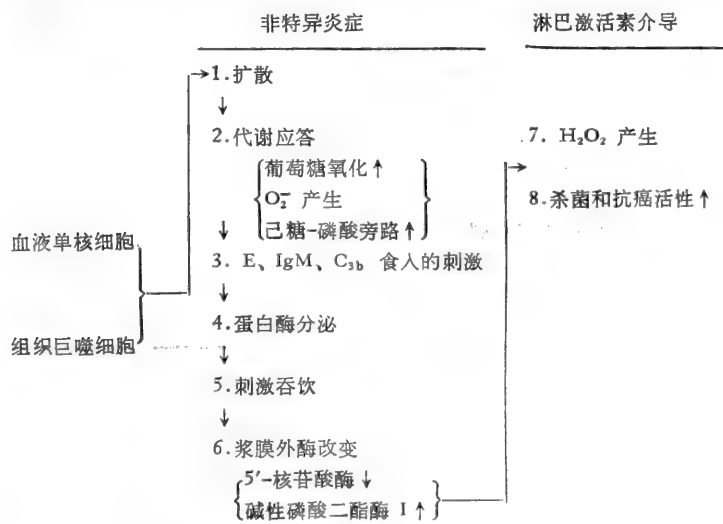
灵芝);有的加速抗体的形成(肉桂、仙茅等);有的使抗体在体内保持更长时间(玄参、灸必甲)。总之,不少中药能提高机体非特异的免疫力^[25]。

(2) 激活巨噬细胞的变化 激活的巨噬细胞在形态、功能及代谢上发生显著变化。对玻璃的粘附作用增强,能迅速扩散,可达对照组的8倍以上。1978年 Cohn 的研究证明^[32],在激活巨噬细胞的过程中能产生一种扩散因子(B_6),是具有分子量为65,000的多肽,可调节巨噬细胞的移动。由于激活的巨噬细胞表面皱褶及活动性增强,浆膜广泛内陷,促进吞噬与胞饮作用。巨噬细胞被激活之后,还能分泌多种可溶性物质(如溶菌酶、酸性水解酶、中性蛋白酶类等),使吞噬及消化作用完善,更有效地消除细菌和杀伤癌细胞。现分述如下:

首先,在形态结构上,可见体积增大,因胞浆中蛋白质含量增多,上述 B_6 因子也有调节巨噬细胞大小的效应。电镜所见,表面膜更为致密。浆膜外酶明显改变,5'-核苷酸酶含量明显下降,因该酶在吞噬体内迅速灭活之故。与此相反,碱性磷酸二酯酶 I 的含量可升高2~3倍。这两种酶也许是巨噬细胞激活的特异改变。此外,ATP 酶亦明显地可升高,巨噬细胞表面膜的行为是一种主动耗能的活动,ATP 酶可催化 ATP 分解放能以供需要。激活的巨噬细胞固吞噬功能增强,在其胞浆中还增有大量的吞噬体。

另外,在代谢上亦有很多改变,例如 MIF 诱发的巨噬细胞,其己糖磷酸旁路氧化作用和葡萄糖参入均增强。腹腔巨噬细胞激活后氧耗量增加。1978年 Cohn^[32]指出,炎症巨噬细胞和结核杆菌(BCG)接种动物的巨噬细胞,二者均释放超氧化物阴离子(O_2^-)。而BCG接种的小鼠,以PPD(纯蛋白衍生物)诱导,获得的腹腔巨噬细胞,过氧化物酶阳性,对肿瘤细胞有细胞毒作用,而未注入BCG的动物,以PPD诱导的腹腔巨噬细胞,则过氧化物酶阴性,对肿瘤细胞无细胞毒作用,可见,二者在代谢上有差异。

(3) 巨噬细胞激活过程 巨噬细胞激活是一个复杂的过程,在体内受多种因素的影响,进行一系列免疫学的、生物化学的变化后,提高杀菌、抗癌的能力。1978年 Cohn^[32]根据体内外实验,提出组织巨噬细胞及血液单核细胞的激活为以下的过程:



↑表示增加,↓表示减少

2. 抑制

以前,对巨噬细胞功能活性低下最常考虑的是网状内皮系统受到障碍,其实不然,巨噬细胞的免疫应答效能亦极为重要,因有许多物质可影响巨噬细胞的免疫应答,就象摘除胸腺、法氏囊和脾脏的新生动物,并不损害巨噬细胞的吞噬功能,但用抗巨噬细胞血清(AMS)及抗淋巴细胞血清(ALS)处理则能特异性地抑制巨噬细胞的活性。病毒,某些原虫及细菌感染均可抑制巨噬细胞^[25,29]。

放射线、大剂量皮质激素及某些抗代谢物质能非特异地抑制巨噬细胞的吞噬消化功能;而硅和胶体钍能损伤巨噬细胞,即先由巨噬细胞吞噬,后致巨噬细胞死亡^[29]。

五、巨噬细胞分泌的可溶性活性物质

过去认为巨噬细胞的主要功能是细胞参与的免疫反应(如加工处理抗原)。近来,越来越多地报道巨噬细胞可以因受某种刺激,而分泌多种可溶性活性物,借助这些活性分子来调节免疫功能,有的作用于免疫反应细胞,有的作用于抗原,有的增强吞噬、消化作用(如酶类)。现就其对淋巴细胞的激活,肿瘤细胞的杀伤以及对炎症相关方面,加以分述。

1. 淋巴细胞激活因子(LAF)

体外培养的巨噬细胞能产生一种可溶性分子——LAF,分子量较低(5,000~15,000道尔顿),对热极不稳定,也不透析,是作用于T淋巴细胞的活性因子,提高胸腺细胞及周围T淋巴细胞对抗原、有丝分裂原(Mitogen)、植物血凝素(PHA)及伴刀豆球蛋白A(ConA)的应答,增强T淋巴细胞活力,加速其分化为更成熟的阶段(如细胞毒效应细胞);而不能提高B淋巴细胞对有丝分裂原(脂多糖)刺激的应答,但巨噬细胞培育的上清液能使体外B淋巴细胞的生存及增殖加强^[33,34]。

2. 遗传相关巨噬细胞因子(GRF)和非特异巨噬细胞因子(NMF)

1977年 Erb等^[35]证明,体外辅助T淋巴细胞的增殖,需要巨噬细胞或巨噬细胞产生的可溶性因子——GRF、NMF参与,此二因子对辅助T淋巴细胞的激活作用有不同,GRF激活T₁细胞,而NMF激活T₂细胞。T淋巴细胞前身从骨髓进入胸腺后,发育分化为T₁、T₂、T₃、T₄等亚类,它们的生物学特征不同,T₁寿命短,T₂寿命长。T₂才开始有免疫活性,T₃则能产生淋巴因子,因此,GRF及NMF是激活辅助T细胞前身不同阶段的活性细胞。

3. 绵羊红细胞溶解因子

这是巨噬细胞产生的另一类可溶性物质,作用于抗原,而不作用于淋巴细胞,且其功能仅激活B淋巴细胞对羊红细胞(SRBC)的反应,这一问题,首先是1971年 Hoffman等报道,即培育的巨噬细胞上清液能使脾淋巴细胞激活,恢复空斑形成细胞(PFC)的应答。又由于B淋巴细胞激活物常是多重复抗原决定簇(如DNP-POL或内毒素)的聚合物,而且,此聚合形成的抗原能够直接激活B淋巴细胞,并不需要巨噬细胞或T淋巴细胞

的协助,故认为此类可溶性因子的作用机制是使 SRBC 从颗粒性抗原变为溶解的聚合物片段,从而该片段亦能直接激活 B 淋巴细胞^[33,34]。

某些合成化合物(如人工合成的2-巯基)乙醇(2-ME)在体外能替代巨噬细胞,增进淋巴细胞的激活。体外实验证明,2-ME 可以恢复没有巨噬细胞的鼠脾细胞对 SRBC 的应答,若再加入一定量的巨噬细胞和 2-ME 一起,亦不增强应答,这便说明 2-ME 可以完全置换巨噬细胞的功能。2-ME 的优点为较易获得,比较稳定。其作用机制可能类似 LAF,作用于淋巴细胞而不是抗原。此外,维生素 E 亦有类似效应^[33,34]。

4. 识别因子 (RF)

特异激活的巨噬细胞表面除有嗜细胞抗体外,还有识别肿瘤抗原的识别因子,使巨噬细胞直接发挥杀伤作用。1975 年 Mansell 等报道^[36]葡聚糖可以增强巨噬细胞对肿瘤的识别作用,如果与 RF 结合使用,可使肿瘤减退,这种减退与 RF 量有关。肿瘤患者血浆中缺少巨噬细胞的“识别因子”,其含量又与肿瘤严重性平行,切除肿瘤后,识别因子可增加。

5. 干扰素 (If)

病毒感染可诱导网状内皮系统巨噬细胞分泌干扰素。在体外用仙台病毒感染于人的白细胞,亦能形成干扰素,分子量接近 25,000。干扰素的抗癌作用,可能是通过抗病毒的机制,并认为干扰素能刺激宿主细胞形成另一种蛋白质,后者与宿主细胞的核糖体结合,从而传递宿主 mRNA,排除病毒 mRNA,但这方面的充分证据尚待深入研究^[37]。

6. 前列腺素 E(PGE)

激活的巨噬细胞也能产生前列腺素 E。干扰素系增加巨噬细胞的杀伤力,而前列腺素则有降低的作用,如果将前列腺素 E 与干扰素同时加到静止的巨噬细胞中,从形态判断,巨噬细胞已被激活,但对肿瘤细胞没有杀伤作用,可见,前列腺素与干扰素的作用是拮抗的,说明巨噬细胞在抗癌作用上受此两种物质的双重调节。由于前列腺素有抑制“激活巨噬细胞”对肿瘤细胞的杀伤力,因此,可以解释某些肿瘤组织中虽出现大量巨噬细胞,但肿瘤仍继续发展恶化^[38]。

7. 肿瘤坏死因子 (TNF)

接种卡介苗的小鼠,注射内毒素后,其血清能使移植肉瘤出血坏死,这是内毒素诱导巨噬细胞产生了一种能直接杀死肿瘤细胞的 TNF。血清 TNF 分子量约为 150,000,是糖蛋白。小鼠肝中提出的 TNF,分子量较血清中者小。TNF 能特异地杀伤肿瘤细胞,而对正常细胞无抑制,是理想的抗癌物,故有人^[39]试图利用大动物(猪、绵羊等)来生产 TNF。作用机制尚不清楚,现假设为激活巨噬细胞具有释放溶酶体酶的作用,该酶可能有识别正常与恶性细胞的能力。

8. 几种跟炎症相关的酶

已如前述,巨噬细胞是机体吞噬能力最强的一种细胞,它在炎症应答过程中,可产生及分泌大量酶类,将吞入的细菌或病毒予以消化,分泌出细胞的酶,在外环境中仍发挥其

效应。炎症刺激下,巨噬细胞分泌的酶,目前已知有如下三类^[40,41]:

(1) **酸性水解酶类** 诱发慢性炎症的物质都能使巨噬细胞大量释放酸性水解酶,引起慢性炎症的组织损伤。

(2) **中性蛋白酶类** 包括血浆蛋白溶酶原活化剂(plasminogen activator)、胶原酶(Collagenase)及弹性蛋白酶(Elastase)。这类酶对慢性炎症组织的破坏和修复中具有重要作用。

(3) **溶菌酶** 是分子量较低的蛋白质。有较强的杀菌力,能分解细菌壁中 N-乙酰胞壁和 β -1, 4-N-乙酰葡萄糖胺键,从而使细菌瓦解。

参 考 文 献

- [1] Furth, R. V. *Bulletin WHO*, 1972, 845—852.
- [2] 杨景山: 北京医学院学报, 1979, 1, 60—63.
- [3] Roberts, B. V. *The Macrophage*, 1972, 1—5.
- [4] Cohn, Z. A. *Adv. Immunol.*, 1968, 9, 164—199.
- [5] Cline, M. J. *The White Cell*, 1975, 459—478.
- [6] Roberts, B. V. *The Macrophage*, 1972, 17—30.
- [7] Rabinovitch, M. et al. *J. Immunol.*, 1972, 110, 655—701.
- [8] Lay, W. H. et al. *J. Exp. Med.*, 1969, 128, 991—1007.
- [9] 胡世真等: 第三届生物化学会议论文摘要汇编, 1979.
- [10] Nelson, D. S. *Immunobiology of the Macrophage*, 1976, 259—272.
- [11] Reayen, E. P. et al., *J. Cell Biol.*, 1973, 59, 12—27.
- [12] Oliver, J. M. *Nature*, 1975, 253, 471—473.
- [13] Oliver, J. M. *Immune Recognition*, 1975, 445—471.
- [14] Cline, M. J. *The White Cell*, 1975, 483—484.
- [15] Nelson, D. S. *Immunobiology of the Macrophage*, 1976, 91—108.
- [16] Franzl, R. E. *Nature*, 1962, 195, 457—458.
- [17] Inchley, C. J. et al. *Clin. Exp. Immunol.*, 1969, 5, 189—198.
- [18] Uhr, J. W. et al., *J. Immunol.*, 1965, 94, 544—550.
- [19] Opitz, H. G. et al., *Cell Immunol.*, 1975, 16, 379—388.
- [20] Kirchner, H. *Europ. J. Cancer*, 1978, 14, 453—459.
- [21] McCutcheon, M. *Physiol. Rev.*, 1946, 26, 319—336.
- [22] Shin, H. S. et al. *Science*, 1968, 162, 361—363.
- [23] Nelson, D. S. *Immunobiology of the Macrophage*, 1976, 350—363.
- [24] Cline, M. J. *The White Cell*, 1975, 493—503.
- [25] 余贻: 药品与生物制品, 1977, 5, 270—282.
- [26] Evans, R. et al., *Nature*, 1972, 236, 168.
- [27] Loveren, H. V. et al., *J. Nat. Cancer Inst.*, 1974, 52, 1917—1918.
- [28] Ptka, W. et al., *J. Immunol.*, 1975, 115, 796.
- [29] Friedman, H. *Fed. Proc.*, 1978, 37, 102—104.
- [30] North, R. J. *J. Immunol.*, 1978, 121, 806—809.
- [31] Karnovsky, M. L. et al., *J. Immunol.*, 1978, 121, 809—813.
- [32] Cohn, Z. A. *J. Immunol.*, 1978, 121, 813—816.
- [33] Oppenheim, J. J. et al., *Prog. Allergy*, 1976, 20, 141—144.
- [34] Nelson, D. S. *Immunobiology of the Macrophage*, 1976, 163.
- [35] Erb, P. et al. *J. Immunol.*, 1977, 119, 206.
- [36] Mansell, P. W. A. et al. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1975, 54, 571—580.
- [37] Cline, M. J. *The White Cell*, 1975, 310—312.
- [38] 章顺春: 国外医学, 1979, 7, 344.
- [39] 乐逸民: 医学参考资料, 1977, 12, 579.
- [40] Nelson, D. S. *Immunobiology of the Macrophage*, 1976, 428—457.
- [41] Osserman, E. F. *New Engl. J. Med.*, 1975, 292, 424—425.

免疫活性细胞及其分离纯化*

朱炳法 邵国英

(上海第二医学院、上海市免疫学研究所)

一、免疫活性细胞

1. T 细胞及其亚群
2. B 细胞及其亚群
3. K 细胞
4. NK 细胞
5. 双标记细胞(D 细胞)

二、免疫活性细胞的分离纯化

1. 静置或低速离心
2. 明胶及右旋糖酐分离

3. 密度梯度离心

4. 物理吸附分离法

5. 免疫吸收或亲和柱分离法

6. 花环形成分离法

7. 细胞电泳分离法

8. 单层细胞免疫吸收分离法

9. 特异淋巴细胞破坏或灭活的分离法

10. 荧光激活细胞分离仪(FACS)分离法

免疫活性细胞(Immunologically competent cell)是指能特异地识别抗原(即接受抗原刺激)并随后分化增殖,产生抗体或淋巴因子,从而发挥特异性免疫反应的一类细胞群。根据这个定义,只有T及B淋巴细胞才属于免疫活性细胞。然而,近年来发现的其他几类淋巴细胞也参与免疫反应,如K细胞、NK细胞、D细胞(双标记细胞)。有人将这几类淋巴细胞也归入免疫活性细胞。由于单核吞噬细胞既参与非特异性免疫,在特异性免疫的形成中也起着重要作用,因此有人将单核吞噬细胞也列入免疫活性细胞中。本文着重介绍T、B、K淋巴细胞的分离纯化。

一、免疫活性细胞

免疫活性细胞来源于多能干细胞,在胚胎期,干细胞最早出现在卵黄囊的血岛(第三周),以后在肝脏(第六周至出生前),最后主要存在于骨髓内(五个月后直至成年),淋巴细胞系统的干细胞从淋巴母细胞逐步发育,经大淋巴细胞、中淋巴细胞至小淋巴细胞,成为未定型的免疫活性细胞,这是具有潜在免疫能力的小淋巴细胞。经过胸腺或法氏囊(腔上囊或囊类似组织)繁育分化增殖后,成为定型的免疫活性细胞,已能特异地识别抗原异物并能对抗原起特异性免疫反应。

1. T 细胞及其亚群

从胚胎发育第十一周起即有一些干细胞经过血液移动到胸腺,在胸腺激素的作用下,分化为胸腺依赖淋巴细胞即T淋巴细胞。一般将从卵黄囊、胎肝和骨髓中来的多能干细

* 承余滨、陆德源教授审阅,特此致谢。

表 1 小鼠 T 细胞的分化

	表面标志—抗原	机 能
淋巴球系干细胞	BAT?	?
胸腺前细胞或前 T 细胞 (pre-T Cell)	BAT (+) Thy-1 (-) Ly- (-)	NK ADCC?
分化 胸腺体液因子 →		
胸腺后细胞	BAT (+) Thy-1 (+) Ly (+)	致分裂原反应
识别 胸腺上皮细胞 →	已、非已	
T Cell	BAT (+) Thy-1 (+) Ly (+) Ia (-/+)	致分裂原反应 混合淋巴细胞反应 辅助 (Ly1) 抑制 (Ly2.3) 杀伤 (Ly2.3) 迟发型变态反应 (Ly-1)

胞(即 T 细胞的干细胞)称为胸腺前细胞,而将经过胸腺繁育并分化成熟的称为胸腺后细胞,即 T 淋巴细胞。T 细胞在上述分化过程中,其表面标志(包括受体和抗原)及功能均有相应的变化^[1](详见表 1)。这类细胞分布定位于周围淋巴结的副皮质区及脾脏白髓,并不断释放到外周血循环中。受到抗原刺激后,进一步分化增殖,发挥特异性细胞免疫作用。现在发现,T 细胞并非均一的细胞群,根据其发育阶段、表面标志或功能,又可分为若干亚群,有关分类原则和命名尚未经国际统一。早年按个体发育不同阶段将 T 细胞分为胸腺前细胞、胸腺后细胞,后者至少可分为 T₁~T₅ 五个亚群,T₁ 存在于胎肝,新生儿脾脏及周围淋巴组织中,具有 Thy-1 抗原,又称 θ (Theta) 抗原,无免疫活性,在胸腺激素影响下分化成 T₂,后者存在于血液、淋巴液及周围淋巴组织的胸腺依赖区,具有 θ 抗原、有免疫活性、参与再循环、长寿命、对射线不敏感,可能负责免疫监视作用,也可能是一种免疫记忆细胞。T₃ 存在于周围淋巴组织,不参与再循环,具有特异性抗原受体,当抗原结合于受体后能产生淋巴因子,可能是效应 T 细胞或细胞毒性 T 细胞,能杀伤主要组织相容性复合物不同的异体移植细胞,也能杀伤突变的肿瘤细胞和受微生物感染的细胞。T₄ 存在于脾脏、淋巴结和骨髓,对射线不敏感, θ 抗原阳性,也是一种记忆细胞,这是 T 细胞受抗原刺激后,中途停止分化处于静止状态的细胞,其在体内存活时间较长,能将抗原信息长期保留在细胞,以后一旦再遇到同样抗原刺激,可迅速分化增殖,加快产生淋巴因子或直接杀伤,这种细胞能适应紧急需要,长期保持免疫力。T₅ 存在于血循环,胸腺皮质区和脾脏淋巴结的胸腺依赖区,不参加再循环,对类固醇激素及射线敏感,是一种辅助 B 细胞产生抗体的 T 细胞,也可能是一种短寿命的免疫记忆细胞。1975 年, Cantor 和 Boyse^[2,3] 按分化抗原 (Ly 抗原系统) 将 T 细胞分为三个亚群: Ly1、2、3 均阳性的 T 细胞,是一种不成熟的短寿命的前体细胞,占外周血液 T 细胞的 50%,可能参与移植物抗宿主反应,清除突变细胞、失去控制的“禁株细胞”及病毒感染的宿主细胞。Ly1 阳性细胞可能是辅助其他细胞发挥免疫功能的 T 细胞,占外周血液 T 细胞的 30%。根据其辅助的靶细胞不同,命名亦不同。如在体液免疫中协助 B 细胞产生抗体的称辅助性 T 细胞;在

细胞免疫反应中协助其他 T 细胞亚群、起放大细胞免疫作用的称放大 T 细胞；能协助巨噬细胞产生迟发型变态反应的称迟发型变态反应激发 T 细胞。具有 Ly2、3 的细胞可能有杀伤及抑制作用，占外周血液 T 细胞的 5~10%，这种 T 细胞能直接杀伤靶细胞；还能经伴刀豆球蛋白 A (Concanava llin A, 简称 ConA) 激发后产生可溶性免疫反应抑制因子，这种因子能抑制体液免疫反应，动物实验证明，对已发生全身播散性红斑狼疮小鼠有治愈作用，若预先给予还有预防作用^[4]，上述二种分类存在着一个共同缺点是，一种 T 细胞亚群可同时具有二种或更多功能。为弥补此点，1977 年，有些人^[5-7]，根据 Ly 系统、Ia 抗原、Fc 受体等将 T 细胞分为五个主要亚群，这五个亚群的功能并不交叉（表 2）。

表 2 T 细胞亚群的分类

T 细胞亚群 简称	Ly 系统	Ia 抗 原	Fc 受体	靶细胞
抑制性 T 细胞 (T _s)	Ly 2 3	+	-	T、B 细胞
辅助性 T 细胞 (T _H)	Ly 1	±	-	B 细胞
杀伤 T 细胞 (T _C)	Ly 2 3	-	-	各种细胞
放大 T 细胞 (T _A)	Ly1 或 Ly 2 3	-	+	T _s 、T _C 细胞
迟发型变态反应激发细胞 (T _{DTH}) 或细胞免疫介导 T 细胞 (T _{CMI})	Ly 1	+	-	巨噬细胞

人类 T 细胞亚群是按其表面 Ig 受体及功能而分的^[8-10]，带 IgGFc 受体者为抑制性 T 细胞，对体液、细胞免疫均有抑制作用；带 IgM Fc 受体者为辅助性 T 细胞，对 B 细胞产生抗体有辅助作用；带 IgA Fc 受体 T 细胞也有辅助作用^[11]；带 IgE Fc 受体 T 细胞在 IgE 合成中有调节作用^[12]。带 IgD Fc 受体 T 细胞的功能尚未明瞭^[13]。

综上所述，T 细胞亚群分类方法虽多，但尚缺乏较满意的方法。按功能分类似乎较好些，但也有争论，如有些人^[14]认为上述五个亚群中主要是 T_s、T_H、T_C，他们将 T_A、T_{DTH} 归入 T_H，这样 T_H 按其作用的靶细胞不同又分为三类：对 T_s、T_C 起作用的为 T_A；对巨噬细胞起作用的为 T_{DTH} initiator；对 B 细胞起作用的为 T_{H0}。

2. B 细胞及其亚群

胚胎期另一部分干细胞从卵黄囊、胚肝和骨髓移行到直肠上面的腔上囊(鸟类)，人和

表 3 人类 B 细胞的分化

骨 髓	血 液			
	增殖	成熟		
	干细胞	囊前细胞	囊后细胞	B 细胞(血循环中)
			(B ₁ 、B ₂)	
鼠标记胸腺嘧啶参入	+	-	-	-
B 细胞抗原	+~++	+	+	+
SmIg	-	+	+~++	+~++
胞浆 IgM	+	-	-	-

哺乳动物则通过类囊组织(肠壁集合淋巴结、阑尾淋巴组织、扁桃腺)或骨髓,在其中发育分化。从不具有免疫活性的囊前细胞分化为具有免疫活性的囊后细胞,即B淋巴细胞。B细胞在上述分化过程中,其表面标志、抗原、代谢活性均有相应变化^[15](表3)。促使B细胞分化成熟的腔上囊内的体液因子已被分离出,称为囊素(Bursin)也称泛含素(ubiquitin),是一种多肽,其活性部分已可人工合成。B细胞成熟后分布于血液、周围淋巴结的生发中心、浅皮质区和髓索及脾脏的生发中心—红髓髓索。在外周血液中B细胞仅占20~30%而T细胞占60~70%,B细胞是一种短寿命(数天到数周)的小淋巴细胞,较少进行再循环,因为T细胞在循环中捕获抗原后带到周围淋巴组织交给B细胞,使后者分化增殖发展成浆细胞产生抗体。产生抗体的第一步是抗原与B细胞的表面膜免疫球蛋白(SmIg)结合,一种B细胞仅能与一种抗原相结合。在未经免疫刺激的动物中,其淋巴细胞与一定种类抗原发生特异性结合的机会仅 $1/10^2 \sim 1/10^5$,如经过多次免疫刺激后,则可增加5~100倍。B细胞亚群分类也尚未统一,有人分三个亚群,B₁细胞能合成免疫球蛋白,并能分泌抗体,细胞膜上有C_{3b}及Fc受体和SmIg;B₂细胞虽能合成Ig,但却几乎不能分泌出抗体,细胞膜上没有C_{3b}受体,也无SmIg,只有不稳定的免疫球蛋白决定簇;B₃细胞是免疫记忆细胞,在抗原刺激后,中途停止分化,它在体内存活时间较久,能把抗原信息长期保存在细胞内,当以后再遇到相同抗原时,可以迅速分化增殖并转变为浆细胞,加速特异性抗体的产生。上述B细胞亚群系按C_{3b} Fc受体及SmIg的密度而分^[16]。也有人按产生抗体时是否需要T细胞协作而分两个亚群,B₁产生抗体时,不需T细胞的协作,B₂则需要。还有其他分类法,如根据SmIg的类型即 δ/μ 的比率^[16],但也未经国际统一,且不甚满意。

3. K 细胞

K细胞是直接来自骨髓的淋巴样细胞,它不依赖于胸腺,切除胸腺的新生动物的脾、淋巴结中仍有K细胞存在;应用抗 θ 血清破坏脾、淋巴结中的T细胞后,仍有K细胞功能存在;在先天性无胸腺小鼠(nude mice),也仍有K细胞活性。K细胞不带SmIg,鸟类切除腔上囊后K细胞活性也不受影响;先天性无丙种球蛋白血症病人的K细胞活性仍正常或仅稍有异常。K细胞没有吞噬作用,也没有粘附性能,过氧化物酶染色阴性。总之,K细胞与T、B细胞、巨噬细胞均不相同^[17]。但BarBer^[29]认为K细胞来源于B细胞。外周血液中K细胞占5~15%,K细胞的功能是通过其膜上Fc受体和靶细胞上抗原结合的相应抗体的Fc段发生反应而发挥的。杀伤过程是通过胞外非吞噬的方式实现的,被杀伤的靶细胞是非特异性的,且无选择性,因为只要靶细胞上抗原与IgG型特异性抗体结合,抗体的Fc段被活化,K细胞的Fc受体就能与这种活化Fc段结合,故又称抗体依赖细胞介导的细胞毒作用(Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; ADCC)。K细胞也有C₃受体,但最近Eremin等^[18]报道,K细胞活性和带Fc受体而无C₃受体的淋巴细胞(Fc^+ 、 C_3^-)有关,而 Fc^+ 、 C_3^+ 的淋巴细胞则缺乏K细胞活性。他们通过大鼠、豚鼠和兔的血液及脾脏淋巴细胞的实验后提出上述意见。 Fc^+ 、 C_3^+ 淋巴细胞虽不能杀伤IgG致敏的靶细胞,但却能与 $Fc^+C_3^-$ 淋巴细胞竞争,从而降低ADCC活性。

4. NK 细胞

近年来,许多学者在研究机体杀肿瘤细胞的各种效应细胞时发现,有一类淋巴细胞毋须预先致敏即有迅速破坏肿瘤细胞的作用,这一类细胞和致敏 T 细胞、K 细胞、活性巨噬细胞均有许多不同,故称自然杀伤细胞 (NK 细胞),又称自发的淋巴细胞介导的细胞毒性 (spontaneous lymphocyte-mediated cytotoxicity, SLMC)。NK 细胞能杀伤病毒感染的细胞,也参与骨髓移植的排斥反应,但最主要作用是杀伤各种类型的肿瘤细胞,因而若干学者强调,NK 细胞是免疫监视的第一道防线^[19-21],是机体在肿瘤尚未出现临床症状或肿瘤极小时的主要抗肿瘤机能。NK 细胞在小鼠、大鼠及人类外周血液、脾、淋巴结、扁桃腺、骨髓、腹腔均可发现,其中以外周血液和脾脏中最高,胸腺中尚未发现。根据 NK 细胞的表面特征,大多认为与 T、B、K 细胞不同^[22]。但也有人认为 NK 细胞膜也有低密度的绵羊红细胞受体,人外周血液 NK 细胞的 40% 能和绵羊红细胞形成花环,其余则不能形成。据此,有人提出^[49],NK 细胞不是均一的细胞类型,一部分是非 T、非 B、非 K 的淋巴细胞,另一部分可能是前 T 细胞^[23](或胸腺前细胞),即骨髓干细胞中 Fc 受体阴性的前 NK 细胞(前 NK_i 细胞),经几天分化成为 Fc 受体阳性的前 NK 细胞(前 NK_s 细胞),后者受干扰素作用很快(几分钟内)成为 NK 细胞,这种 NK 细胞受胸腺激素作用后,衍化为成熟 T 细胞,显然这一部分 NK 细胞可能是 T 细胞系统中的一个组成部分。1980 年上海市免疫学会年会上,英国 Allison 教授认为 NK 细胞是巨噬细胞的前体;Henney 等也持类似看法^[24]。NK 细胞杀伤靶细胞的机理至今尚未完全明瞭,有人认为^[25]NK 细胞膜上有对各种靶细胞抗原的受体,两者结合后发挥杀伤作用,最近 Young 等^[26]发现 NK 细胞上有一种新的表面标志——神经节-N-四-脂酰基鞘氨醇 (ganglio-N-tetraosylceramide),也有人认为^[27] NK 细胞是 K 细胞加天然抗体,即 NK 细胞是另一类 ADCC 的效应细胞。此外, NK 细胞和 K 细胞之间还有几个共同点,(1) 两者均无 T、B 淋巴细胞的表面标志。(2) 均无粘附及吞噬能力。(3) 在体内分布基本相同。(4) 两者还有

表 4 NK 细胞和 K 细胞的比较

	NK 细胞	K 细胞
对胰蛋白酶的作用*	损失活性	无作用
对糜蛋白酶的作用	损失活性	无作用
肾上腺皮质激素	降低活性	无作用
抗免疫球蛋白试剂的作用**	无作用	抑制
可溶性免疫复合物	无作用	抑制
90 锂处理	损失活性	不影响

* NK 细胞是天然抗体粘附于 NK 细胞的 Fc 受体上,胰(糜)蛋白酶能除去抗体,但对 K 细胞的 Fc 受体无作用。

** 抗免疫球蛋白试剂能同结合在靶细胞上的 IgGFc 起反应,所以能抑制 K 细胞活性。

交叉抑制作用,即 NK 细胞的单层靶细胞能吸收 K 细胞,同样,瘤细胞被抗体致敏后,能抑制 NK 细胞的活性。因而有人认为 K 细胞和 NK 细胞可能是同一类型细胞。但多数人仍然认为 NK 细胞和 K 细胞是两类不同的细胞,不过在 NK 细胞表面既有 Fc 受

表 5 几类免疫活性细胞的比较

表面标记、特性或功能	T	B	K	NK	D	
(一) 同种异型抗原(Alloantigen)						
TL	+	-	-	-	-	胸腺白血病抗原在胸腺细胞上亦存在。
Thy-1 (又称 θ)	+	-	-	+	-	Theta 抗原在胸腺细胞中最多,故现称 Thy-1 抗原,其次是在 T 细胞,在脑上皮细胞及成纤维母细胞上也有 (Thy-1.1 为 AKR 小鼠,1.2 为 C ₅₇ H 小鼠)
Ly1. 2. 3. 5	+	-	-	-	-	同种 Ly2.3 分化抗原仅见于胸腺细胞及 T 细胞
Ly4	-	+	-	-	-	而 Ly4 仅 B 细胞有
Ly8	+	-	-	-	-	Ly8 仅存在辅助及效应 T 细胞
Ia	+	++	-	-	-	免疫相关抗原,主要存在于 B 细胞、精子、上皮细胞及巨噬细胞在 T 细胞上有少量
G ^{IX}	-	-	-	-	-	G 区仅存在于小鼠胸腺细胞,是白血病病毒产生的
PC-1	-	-	-	-	-	浆细胞抗原只存在于浆细胞
传染性单核细胞增多症及 SLE 病人血清抗体	+	-	-	-	-	
(二) 异种抗原(Heteroantigen)						
HTLA	+	-	-	+	-	人 T 细胞抗原只在人 T 细胞上有
HBLA	-	+	-	-	-	人 B 细胞抗原只在人 B 细胞上有
脑相关 T 细胞抗原	+	-	-	-	-	
慢性淋巴细胞白血病	-	+	-	-	-	
抗胸腺细胞血清	+	-	-	-	-	
(三) 表面受体: 绵羊红细胞	+	-	-	-	+	
IgG Fc	-	+	+	+/-	+	最近发现 T 细胞中的抑制性 T 细胞有 IgG Fc 受体
IgM Fc	+	-	-	-	-	辅助性 T 细胞有 IgM Fc 受体
C _{3b}	-	+	-/+	+	+	C _{3b} 受体在单核——巨噬细胞,兔血小板,灵长类红细胞亦有
C _{3d} C ₄	-	+	+		+	
SmIg	-	+	-	-	+	
(四) 病毒受体: 麻疹病毒	+	-	-	-	-	
EB 病毒	-	+	-	-	-	
(五) 对促分裂原的反应: PHA	+	-	+	-	-	
PWM	+	+	-	-	-	
大肠杆菌脂多糖	-	+	-	-	-	
聚合的鞭毛素	-	+	-	-	-	
(六) 粘附性能	-	+	-	-	-	利用此特性,可将玻璃珠、尼龙珠、甚至脱脂棉等将 T、B 细胞分离
(七) 对 IgG 致敏靶细胞杀伤性能	-	-	+	±	-	这种杀伤性能称 ADCC
(八) 电泳移动	快	慢				用细胞电泳仪可将 T、B 细胞分开
(九) 扫描电镜	表面光滑	表面有突起	-	-	-	根据 T 细胞表面光滑, B 细胞表面凹凸不平有许多突起可区别此二细胞
(十) 对理化因素的敏感性:						
甲基苯肼	+	-	-	-	-	
硫唑嘌呤	+	-	-	-	-	
环磷酰胺	-	+	-	-	-	
抗淋巴细胞血清 (ALG)	+	-	-	-	-	
射线	-	+	-	-	-	
(十一) 生物功能	细胞体液免疫,免疫	ADCC	自然杀伤	不明		

体,又有独特的多种互不相同的受体,所以出现上述相互交叉的复杂现象。NK 细胞和 K 细胞比较如表 4。

5. 双标记细胞 (D 细胞)

在人外周血液中,尚发现占淋巴细胞 2~3% 的 D 细胞,其膜表面同时具有 T 和 B 细胞的表面标志,D 细胞的来源、功能尚待进一步研究^[28,29]。但据现有资料提示,D 细胞与大多数淋巴组织增生症有关^[30]。

综上所述,免疫活性细胞的分类除按其功能及理化特性外,主要根据表面标志。深入研究免疫活性细胞的表面标志,不仅可更明确地将免疫活性细胞分成若干群及亚群;而且也是分离纯化免疫活性细胞的重要依据。还可提供它与免疫反应、疾病的发生及诊断等关系,如近年来较多人建议,用免疫活性细胞的类型作为白血病的分类依据,现将几类免疫活性细胞的表面标志、特性和功能比较于表 5。

二、免疫活性细胞的分离纯化

免疫活性细胞的分离纯化主要是淋巴细胞的分离纯化。其纯度随实验要求而异,一般细胞免疫实验,如巨噬细胞移动抑制试验,混合淋巴细胞反应等,只须静置或低速离心即可应用。但有些难度较高的实验,如 T 细胞亚群的分离及功能测定、免疫活性细胞受体或表面标志的研究等,则必须具有很高的纯度才能达到要求。近年来,由于细胞免疫涉及肿瘤免疫、移植排斥反应、抗感染等现代医学中的几个重大课题,而在进行细胞免疫研究前,必须分离纯化免疫活性细胞。因此,几年来国内外探索出许多分离纯化免疫活性细胞的方法,这些方法大部分是根据细胞的表面标志、理化性状及功能而设计的。

1. 静置或低速离心

将肝素抗凝血(每毫升血加入 10~20 国际单位肝素)置针筒中,针尖向上,静置 1 小时左右,红细胞沉至下层,血浆层内含较多的白细胞,在红细胞之上的白色层中白细胞数量更多。将血浆及白色层小心推入试管,洗涤后计数即可使用。

肝素抗凝血注入离心管后,置 37℃ 一小时,以 100g 离心 10 分钟,吸出红细胞上面的白色层,此层亦含有较多的淋巴细胞。

用静置或低速离心分离的纯度差,不仅含免疫活性细胞,而且还混杂单核细胞、血小板及粒细胞。但由于操作简便,且所需时间较短,细胞活性较好,适用于一般细胞免疫实验。

2. 明胶^[31]及右旋糖酐分离^[32]

一份 3% 明胶 (gelatin) 溶液加 3 份肝素抗凝血或脱纤维血混合后,置 37℃30 分钟,吸取上层细胞悬液,洗涤即可。

6% 右旋糖酐(分子量 7~40 万均可,40 万效果较好)与等量肝素抗凝血或脱纤维血混匀后置 37℃30 分钟,吸取上层细胞悬液。下层再加等量 6% 右旋糖酐重复一次。收集的细胞悬液经 Hanks 平衡盐溶液 (HBSS) 洗涤二次即可应用。

本法也混杂较多的粒细胞、单核细胞、血小板及红细胞、故纯度为 60~70%。

3. 密度梯度离心^[33,34]

外周血液中各种细胞的体积、形状及比重均稍有不同,粒细胞及大单核细胞的比重虽与淋巴细胞相差不大,但体积都较淋巴细胞大。较大细胞的密度往往小,这是由于轻的胞浆与致密的核的比较大。红细胞的体积虽与淋巴细胞相似,但比重较大(红细胞比重为 1.093,淋巴细胞只有 1.075~1.090),且应用高分子聚蔗糖(Ficoll)后,结成串状,体积增大。用本法分离淋巴细胞是应用比重为 1.077 的聚蔗糖——泛影葡胺分离液(Ficoll-Hypaque, 20℃ 比重为 1.077 ± 0.002)作密度梯度离心,使一定比重的细胞按相应密度梯度分布,从而将各种血细胞分离开。

密度梯度离心分离纯化免疫活性细胞的原理从沉降速度公式中更可得到证实。

$$\text{沉降速度} = \frac{2r^2(Q - Q_0)g}{9\theta\eta}$$

r 表示颗粒半径; Q 表示颗粒比重; Q_0 表示溶液比重; g 表示离心力; η 表示溶液的绝对粘度; θ 表示形状因子,即颗粒的摩擦系数与其同容积的球形颗粒摩擦系数的比值。

从沉降速度公式中可以看出,颗粒的体积越大(r 越大),其与溶液的比重差越大($Q - Q_0$ 越大),在一定离心场中的离心力越大(g 越大),那么其沉降的速度就越快。粒细胞、单核细胞及接触高分子聚蔗糖后的红细胞的体积均比淋巴细胞大,故这些细胞的沉降速度亦快,因此能分离到纯净的淋巴细胞。

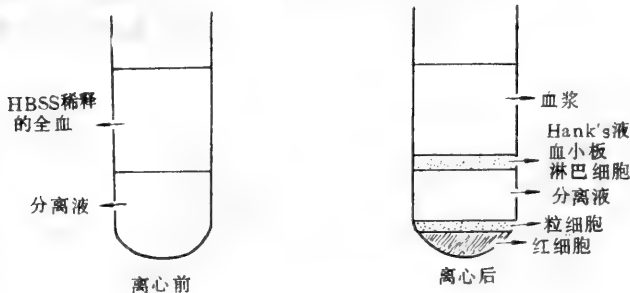


图1 密度梯度分离前后

密度梯度离心分离纯化淋巴细胞的操作方法也比较简便。将肝素抗凝血用 HBSS 或生理盐水稀释 1~3 倍,充分混匀后,沿管壁加至 1.5~2.0 毫升分离液上面,务必形成清楚的两层,而后以 1,500 转/分水平离心 20 分钟(约 400g),此时试管可明显地出现五层(图 1)。仔细吸去最上层血浆后,再吸取第二层,亦可将滴管透过血浆层,小心吸取第二层,此层富含淋巴细胞,纯度可在 95% 左右,偶而含有少数粒细胞。我们在实践中发现,在脐血及某种病人血液的淋巴细胞层中常混有红细胞,原因尚不清楚。在管底红细胞层上面有白色薄层,主要是粒细胞,偶见淋巴细胞。必要时,将此层及部分红细胞吸出,混匀后重复上述操作,可提高回收率。所得的淋巴细胞悬液用 HBSS 或生理盐水洗涤 1~2 次(3,000 转/分离心 20 分钟),调整细胞浓度至所需的要求,分别测定纯度、收获率及活力。

$$\text{纯度}\% = \frac{\text{收获淋巴细胞总数}}{\text{收获白细胞总数}} \times 100$$

$$\text{收获率}\% = \frac{\text{收获淋巴细胞总数}}{\text{用于分离的全血中含有的淋巴细胞总数}} \times 100$$

细胞活力测定：取细胞悬液 4 滴加 0.5~2% 台盼蓝 (Trypan Blue) 2 滴，置 37℃ 5~10 分钟后，轻轻吸去上清，将细胞悬液滴于玻片上，加盖玻片，高倍镜检查，活细胞不染色，已死亡细胞呈淡蓝色。在我们实验条件下活力可达 98% 以上。

本法的关键首先是淋巴细胞分离液的质量，比重必须在 1.075~1.073 之间，最近上海试剂二厂的产品 (20℃ 比重为 1.077±0.002) 尚较满意。原瓶启封后，应储冰箱，不能有细菌繁殖，否则分离效果不佳，我们在实验中遇到过这个问题。其次是全血用 HBSS 或生理盐水稀释后，充分混匀，可极大地提高收获率及纯度。我们发现掌握这两点，收获率可达 80~90%，纯度在 95% 以上，活力在 98% 以上。若在密度梯度离心前，全血先经 6% 右旋糖酐分离，吸取富含白细胞之上清液，再作密度梯度离心可进一步提高淋巴细胞纯度。

密度梯度离心不仅能分离外周血液中的淋巴细胞，而且还能分离骨髓或扁桃腺等淋巴组织中的免疫活性细胞。用不同浓度的小牛血清白蛋白 (BSA) 作密度梯度分离，可分离出 T、B 细胞。操作时先以 pH7.2 磷酸缓冲液 (0.15M NaCl—0.01M PBS) 将小牛血清白蛋白 (应无铵离子混杂) 配成相隔 2% 浓度差的不连续密度梯度，将 35% 加在小试管底部，最上层加 17%，而后将 1 毫升被分离的细胞悬液 (组织必须先制成细胞悬液，浓度为 4×10⁸ 细胞/毫升) 小心加在液面上，1,500 转/分水平离心半小时，可将被分离的细胞分成十层，各层所含的免疫活性细胞是不同的。据坂根刚^[35] 报道在第 3~5 层 (即 21~27% BSA) 中主要为 T 细胞，而第 7~9 层 (29~35% BSA) 则是 B 细胞。

4. 物理吸附分离法^[32,36-42]

本法是将淋巴细胞和吞噬细胞 (巨噬细胞、大单核细胞、粒细胞等) 分开的常用而有效的方法，国外已列为常规，有时还可将 T、B 淋巴细胞分开。

Shortman^[36] 将粘附分离法分为主动粘附与被动粘附，前者必须在 37℃ 培养，使某些被分离的细胞有一定的代谢并粘附于柱上。而后者纯粹是物理吸附，因为在 37℃ 或 4~7℃ 分离时，结果均相同。

物理吸附分离法所用的材料有玻璃珠，各种塑料珠及纤维样物质 (如脱脂棉、尼龙棉、玻璃丝等)，近年来，有些人还应用 Sephadex G-10 凝胶过滤法。

(1) 玻璃珠一般采用硅质，直径 450 微米，其他各种塑料珠，尼龙棉、脱脂棉等均无需特殊规格，用蒸馏水洗 4 次 (除脱脂棉外，还可用弱酸溶液洗涤)，每次浸洗 24 小时，洗净后晾干，取一定量的上述任何一种材料装入 2.5×15cm 层析柱内，约装至 1/3~1/2 柱高，然后包装并以 8 磅消毒。使用前先将含 10% 小牛血清 (有的报道用 50% 自身新鲜血浆) 的 1640 培养液加入柱内，放 37℃ 40 分钟，以平衡 pH (7.0 左右) 及温度，还可除去玻璃珠等间隙中的空气。白细胞悬液可采用上述三种方法之一获得，并调整细胞数为 2~4×10⁶ 细胞/毫升。上柱前，先将平衡液放出，然后加 4~5 毫升白细胞悬液，10 分钟后，加上述培养液洗涤细胞，并将柱置 37℃ 培养 30 分钟，再加上液洗脱，流速控制在 1 毫升/分

钟。首先洗下的为纯 T 细胞,范围在最初 15~20 毫升;其次洗出的是含极少量 T 和 B 细胞,这部分洗脱液可至 100 毫升左右;最后洗出的为血小板。而大部分 B 细胞、单核细胞、粒细胞均粘附于柱上,必须采用各种洗脱液才能洗下,如有人用含 EDTA 而不含 Ca^{++} 、 Mg^{++} 培养液洗脱时,先洗下单核细胞,而后为中性粒细胞。

(2) Sephadex G-10 柱过滤分离法^[32]: 首先装柱,取 $2.5 \times 15\text{cm}$ 层析柱,将颗粒大小为 40~120 微米的 Sephadex G-10 加入柱内,约为柱高的 1/3 左右,而后加入含 20% 小牛血清的 1640 培养液,搅拌洗涤 Sephadex G-10,置 37℃,让培养液缓慢流动以平衡 pH 及温度,待流出液 pH 和培养液 pH (7.0 左右)相同时即可加样。将待分离的白细胞悬液调整至 1×10^6 细胞/毫升,混悬于上述培养液中,一次加样 2 毫升左右,加入上述 Sephadex G-10 柱内后,搅拌几次,使待分离的白细胞与 Sephadex G-10 混匀,然后加入适量上述培养液洗脱,一般不需控制流速,洗脱过程还必须每隔 2~3 分钟搅拌一次,洗脱的细胞主要是淋巴细胞,且大多数有活力,单核细胞等则粘附在柱上,上述全部操作,包括装柱、上样、洗脱等均须在 37℃ 中进行。

若将白细胞悬液先用贴壁法或羧基铁 (Carbonyl iron) 法除去单核细胞等,再过上述柱则往往能提高分离淋巴细胞的纯度。

(3) 贴壁法是将白细胞悬液放入培养皿内,置 37℃ 45~60 分钟,然后小心将皿中悬液吸出(或倾倒出)再加入少量含 10% 小牛血清的 1640 培养液轻轻洗培养皿并吸出,如此重复三次,将吸出培养液合并、离心,所得沉淀绝大部分是淋巴细胞。粘附玻璃皿壁的单核细胞等则可用套橡皮管的滴管刮洗,离心,洗涤,待用。有人将贴壁法也列为淋巴细胞分离法之一。

(4) 羧基铁分离淋巴细胞与单核细胞等的原理是利用单核细胞、粒细胞等能吞噬较重的羧基铁,而后离心,将吞噬细胞和淋巴细胞分开。

K 细胞的分离纯化就是将密度梯度分离的白细胞悬液用贴壁法或吞噬羧基铁除去单核吞噬细胞后,再除去 T 及 B 细胞即可获得较纯的 K 细胞悬液。去除 T 细胞可采用加入 T 细胞抗体及补体共孵后溶解 T 细胞或加入绵羊红细胞,使 T 细胞与其形成花环,再经密度梯度分离后,交界面上的单个淋巴细胞即是含 B、K 细胞的悬液。将此悬液通过结合有兔抗人免疫球蛋白的 Sephadex G-200 或 Sepharose 4B 柱后,就是较纯的 K 细胞悬液。

物理吸附法分离淋巴细胞的优点是操作简便,短时间内即可完成。但由于吸附是非特异性的,且单核细胞等吞噬细胞和 B 细胞均可吸附,甚至有人认为 T 细胞也能吸附,但一般认为 90% T 细胞不吸附,故首先被洗脱,然而也有少部分 B 细胞也不吸附以致混杂在 T 细胞中;且又有小部分 T 细胞也能吸附,则这部分 T 细胞显然混杂在 B 细胞中了。因此,近年来逐步用免疫吸收及亲和柱代替。

5. 免疫吸收^[43-46]或亲和柱^[47-53]分离法

将抗原或抗体结合至玻璃珠、尼龙棉、Sepharose-2B、聚苯乙烯珠或葡聚糖等基质上,将这些基质装柱后,在待分离淋巴细胞过柱时,即可特异地结合相应淋巴细胞,然后洗脱解离,从而获得较纯且特异的淋巴细胞。其原理可用图 2 表示。

进行免疫吸收或亲和柱分离淋巴细胞时,选择合适材料是很重要的,选择不当,直接

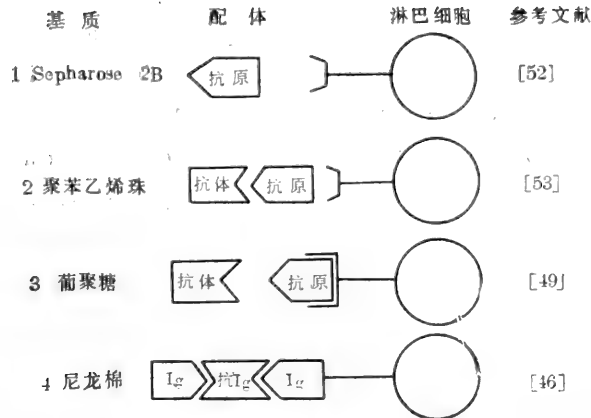


图2 免疫吸收或亲和柱原理示意图

影响分离效果。要挑选适当大小的玻璃珠或塑料珠，一般不大于 $600\mu\text{m}$ ；以 $200\mu\text{m}$ 较适当，这样大小不仅有利于过滤作用，而且也可使流率适当。各种材料的化学组成也相当重要，尤其是亲和柱，常采用的有聚丙烯酰胺、葡聚糖、Sephadex、琼脂糖及 Sepharose。基质与配体的联结也影响分离结果，若联结不牢，容易少量释放下来。被分离细胞表面受体与配体结合的程度随配体的密度增加而增加，因此必须有适当量配体结合至基质上。

被分离淋巴细胞结合至免疫吸收柱或亲和层析柱后，介离是关键一步。常用解离的方法有(1)机械解离，用滴管或针头吹吸使淋巴细胞的受体或 SmIg 从细胞上脱落。如图 3A 所示。(2)竞争抑制解离法，向柱内加入足够浓度(过量)的可溶性抗原或 Ig 以竞争与配体结合的淋巴细胞，一旦游离抗原或 Ig 和细胞表面抗体或受体结合后则被解离。如图 3B、C、D 所示。(3)转换温度以解离与配体结合的淋巴细胞，在 4°C 时结合的，则提高温度至 37°C ，则常能解离；若在 37°C 结合的则降至 4°C 也能解离。如图中 E、F 所示。(4)破坏配体，若抗原与配体的结合通过二硫键，则用 10^{-4}M 巯基乙醇将 —S—S— 还原成 —SH ，结合在柱上的淋巴细胞即被解离。如图 3G 所示。(5)破坏基质，基质为葡聚糖则用葡聚糖酶 (Dextranase) 破坏，也可用胶原酶破坏基质。一旦基质被破坏则结合在柱上的淋巴细胞即被解离。如图 3H 所示。(6)改变温度并破坏基质，若基质是明胶时，由于明胶在 4°C 时形成一种不溶性网架，温度升高至 37°C 则明胶熔化，网架也随之破裂，被结合的细胞即被解离。如图 3I 所示。

由于免疫吸收或亲和柱采用特异性抗原抗体结合或与相应受体结合的原理，故可分离出高度特异的免疫活性细胞，但操作非常复杂，且影响因素很多，因而在实用中受到限制。不过对难以分离的免疫活性细胞还是可以采用。据 Haller 等^[54]报道，用亲和层析可将 NK 细胞与 T、B 细胞分离开，小鼠脾细胞吸附于亲和柱后，用 1.0mg/ml N-乙酰-D-半乳糖胺可洗脱 T 细胞，而用 0.1mg/ml N-乙酰-D-半乳糖胺则洗脱极大部分 NK 细胞。

6. 花环形成分离法^[8-10,55,56]

T、B、K 淋巴细胞都能形成相应花环，T 细胞表面有绵羊红细胞 (SRBC) 受体，能和 SRBC 形成 E 花环；B 细胞表面有 Fc 受体，红细胞 (E) 被相应 IgG 型抗体 (A) 致敏后，EA 复合物通过 IgG Fc 结合至 B 细胞的 Fc 受体，此为 EA 花环；B 细胞表面又

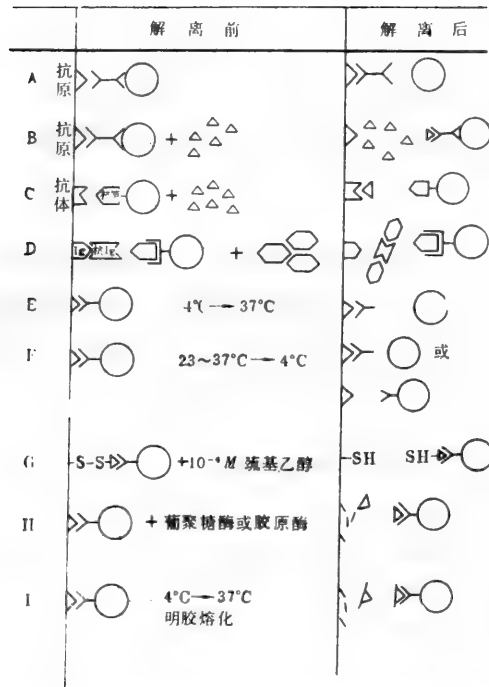


图3 免疫吸附或亲和柱的特定细胞回收方法示意图

有 C_{3b} 受体,红细胞 (E) 被相应 IgG 型抗体 (A) 致敏后能结合 C_{3b} (C), EAC 复合物通过 C_{3b} 与 B 细胞的 C_{3b} 受体结合而形成 EAC 花环;K 细胞表面有 Fc 受体, Rh 阳性 O 型人红细胞 (E) 被抗 Rh 不完全抗体 (IgG) 致敏后,这种 EA 复合物可与 K 细胞 Fc 受体结合而形成另一类 EA 花环,称为 Ripley 花环。尽管带 Fc 受体的其他细胞也能形成这种花环,但由于 K 细胞和这种 EA 复合物结合力比其他细胞强 100 倍,故可用 Ripley 花环来代表 K 细胞^[57]。根据花环形成可以选择性分离某种淋巴细胞,如欲分离 T 细胞,则将密度梯度分离的白细胞悬液,用贴壁法或羧基铁法去除单核细胞后,再和 SRBC 形成 E 花环,然后,轻轻混匀,重复一次上述密度梯度分离法, E 花环和剩余的 SRBC 沉于管底,交界面上为 B、K 等单个的不形成花环的淋巴细胞,吸取沉淀部分。经 37°C 加温振荡解离 SRBC 或用 0.83% 氯化铵破坏 SRBC 后即为纯 T 细胞。交界面上单个淋巴细胞则分别做 EA 花环、EAC 花环或 Ripley 花环而分纯 B 细胞或 K 细胞。最近发现,花环形成试验不仅能将 T、B、K 淋巴细胞分开,而且还可将 T 淋巴细胞分成几个亚群^[8-10]。如将 E 花环周围的 SRBC 解离后,加入牛红细胞 (E) 和相应 IgG 型抗体 (A-IgG) 复合物 (EA-IgG),则 T_r 细胞(含有抑制性 T 细胞—— T_s 细胞)能和 EA-IgG 形成花环。若加入牛红细胞 (E) 和相应 IgM 型抗体 (A-IgM) 复合物 (EA-IgM),则 T_μ 细胞(含有辅助性 T 细胞—— T_H 细胞)能和 EA-IgM 形成花环。由此可以相继分离出纯 T_r 及 T_μ 细胞。我们的初步工作体会到, T_μ 细胞分离纯化较 T_r 细胞困难些^[8]。1979 年底有人报道^[56] T_α 细胞的分离法,牛红细胞 (E) 预先结合三硝基苯 (TNP),然后再以抗 TNP 的 IgA 型抗体致敏 (ET-IgA),凡能同 ET-IgA 复合物形成花环的为 T_α 细胞。1980 年以来又有人报道,与 EA-IgE 形成花环的 T_e 细胞^[12]与 EA-IgD 形成

花环的 T_H 细胞^[43]。

花环形成分离法可分离出较纯的 T、B、K 淋巴细胞，甚至还可分离出五种 T 细胞亚群，对细胞免疫的研究有着极大的实用意义。本法操作并不复杂，所需试剂及仪器亦无特殊要求，又有重要的临床价值，故近年来发展很快，国内外均在蓬勃开展。

7. 细胞电泳分离法^[58,59]

所有动物细胞在 pH7.4 左右均带阴电荷，但所带电荷的多少，决定于细胞类型及细胞的分化程度。因此可根据细胞向阳极移动快慢(速率)而分离各类淋巴细胞。但细胞在电场中的迁移率，不仅受到细胞本身所带电荷多少的影响，而且还受电场强度、介质的粘度、pH 等影响。从下列公式更可以看出这种关系。

$$\nu = \xi \epsilon E / 6 \pi \eta$$

ν 为电泳迁移率 E 为电场强度
 ξ 为细胞或颗粒带电荷多少
 ϵ 为介质常数 η 为介质的粘度

早在 1974 年有人注意到，T 细胞电泳迁移率较快，B 细胞则慢，因此可用细胞电泳仪将 T、B 淋巴细胞分离。在国外细胞电泳仪已有正式商品，我国上海医疗器械十二厂正在试制，尚未正式投产。

细胞电泳分离法除受仪器限制外，在分纯 T、B 细胞时也存在一些问题，如有人发现，B 细胞也会出项于明显高迁移率部分，这部分 B 细胞可能是抗体形成细胞。因此，用细胞电泳仪分离 T、B 淋巴细胞显然是不够理想的。

最近有人^[58]将外周血液先作密度梯度离心，而后在 Buchler poly-prep 100 仪器中电泳 5.5 小时(4℃，20 毫安)，据他们报道，用这种密度梯度电泳，可将 T 和 B 细胞分开，T 细胞是高迁移率细胞而 B 细胞为低迁移率细胞。

Kaplan 等^[59]报道，将花环形成试验和细胞电泳联合应用可分离 T 细胞亚群。T 细胞在 29℃ 和一定数量绵羊红细胞形成高亲和性花环(又称活性花环)，这种 T 细胞亚群具有高电泳迁移率(2.35 微米/秒/伏特)；但在 4℃ 和过量绵羊红细胞形成低亲和性花环(一般称总花环)，则电泳迁移率低(2.15 微米/秒/伏特)。

也有人^[60]联合应用细胞电泳和密度梯度将胸腺细胞分为四个亚群。

8. 单层细胞免疫吸收分离法^[61-65]

Brondz 和 Snegiröva^[65] 1971 年将经 H-2 抗原免疫的小鼠淋巴细胞和含 H-2 抗原的单层细胞孵育后，发现非粘附细胞对靶细胞的免疫溶解活性降低。随后，有人将这种实验方法用于分析 T 细胞抗原结合受体。现在也有人用以分离淋巴细胞。

实际上，本法是以单层细胞代替结合抗原的玻璃珠等免疫吸附剂。操作时，先挑选敏感的细胞铺成单层，被分离的淋巴细胞调整至 10⁷ 细胞/毫升，然后加到单层细胞上面，并不断混匀 1~4 小时，再置 20~37℃ 孵育 2~4 小时，甚至 10 小时，但若分离 B 细胞则只须 4℃。低速离心(80g)5 分钟，常能加速吸收过程。非粘附细胞洗下后，可再与其他敏感细胞的单层培养吸附。已吸附的细胞可用酶解离，如单层细胞为纤维母细胞则用胰蛋白酶处理 37℃ 30 分钟，两种细胞即被解离，然后再用密度梯度分离淋巴细胞和纤维母细胞。若单层细胞是巨噬细胞则用链丝蛋白酶(pronase)在 37℃ 处理 30 分钟，淋巴细胞先洗

下,不过其活性必须培养 16~20 小时才能恢复。

近年来,有人在单层细胞上结合金黄色葡萄球菌 A 蛋白,由于后者能结合带 SmIg 的 B 细胞,因而可分离 B 细胞^[63,64]。单层细胞免疫吸收分离法的最大优点是分离的细胞有高度特异性,最常用于分离杀伤性 T 细胞,也有人用以分离辅助性 T 细胞及迟发型变态反应激发性 T 细胞。

9. 特异淋巴细胞破坏或灭活的分离法^[66-68]

应用高效价抗免疫球蛋白或抗 θ 血清及补体破坏相应淋巴细胞,从而分离另一类淋巴细胞。如将高效价的抗免疫球蛋白血清与补体加入经密度梯度分离的白细胞悬液中,特异地破坏 B 细胞,剩余的则是 T 细胞(可能还混杂 K 细胞及 NK 细胞)。若白细胞悬液中加入抗 θ 血清及补体则能消灭 T 细胞^[66],从而可分离出 B 细胞。进行此项实验时,应在中性 pH 及低离子强度溶液中,补体最好选择兔的,并经过吸收,没有细胞毒性作用。已有人用此方法从小鼠脾脏中制备 B 细胞。

同理,应用放射性同位素标记的抗原或抗体,和相应的淋巴细胞发生特异性结合后,淋巴细胞受到局部辐射后被杀死。常常选择射线在 5 微米内极大部分被吸收的软 β 线,这样才不致损伤邻近细胞,仅特异地破坏与同位素标记抗原起反应的淋巴细胞。 ^3H 及 ^{125}I 是适用的。将人丙种球蛋白 (HGG) 免疫动物后 10 天,从脾脏中分离出淋巴细胞和抗 HGG- ^{125}I -IgG (^{125}I -IgG anti HGG) 保温后能灭活淋巴细胞中的 Ts 细胞,但和 ^{125}I -HGG 保温则不能灭活 Ts 细胞,由此证明脾中 Ts 细胞在 HGG 免疫后其表面有 HGG 结合^[68]。值得提出,应用同位素标记抗原或抗体特异地破坏相应淋巴细胞的方法,主要用于选择性消灭体内某种淋巴细胞,尤其消除形成抗体的 B 细胞。今后若 T 细胞受体抽提成功,也可选择性地破坏 T 淋巴细胞。

10. 荧光激活细胞分离仪 (FACS) 分离法^[69-73]

国外试制这类仪器已达 10 多年,近年来已有正式商品出售(如 Becton-Dickinson Electronic Laboratories),1980 年以来,日本亦有市售 FACS。本仪器的基本原理是将被分离的细胞悬液用荧光抗体染色,然后经超声波处理,再通过一个直径 50 微米的喷嘴,使细胞悬液成极细的微滴,有的微滴含有一个细胞,有的不含细胞,这些微滴流出成单行排列,以每秒钟 10 米速度通过。根据被分离细胞表面有无与荧光抗体相应的抗原及抗原量的多少,即被分离的细胞悬液中各种细胞经荧光抗体染色后所带荧光分子有多有少,(FACS-II 型可测定出每细胞含 3,000 个荧光分子),当受到激光照射时,荧光被激发而转换成脉冲,测定脉冲的多少就可换算出各种不同细胞表面抗原的情况。同时,当单行细胞以较快速度通过两边带 $\pm 2,000$ 伏特的电场时,由于各种细胞表面带荧光有多有少,因而在受激光激发后,各种细胞带电荷也多少不同,则受电场影响后,偏斜程度亦不同,不带电荷的细胞则仍然直线流过,这样在下面分别置各种收集器,即可收集到不带电荷及带电荷多少不同的各种细胞。此外还可测定细胞的大小,因此,将含有各种不同细胞的悬液通过本仪器后,可分离出试验所需要的各种细胞。最近 Tam 等^[74]报道,脾细胞经 FACS 分离后成为两部分,其中一部分的 NK 细胞活性比对照高 4~13 倍,因此,可用 FACS 分离 NK 细胞。

本分离法的最大优点是分离时间较短,五小时可分离出九千万细胞;且被分离的细胞是活细胞,仍然具有各种功能,可供各种免疫活性试验用。唯一的缺点是需要昂贵的仪器。本仪器的基本原理见图4。

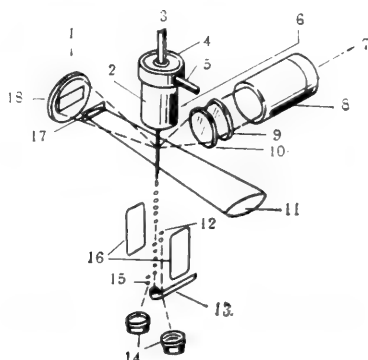


图4 荧光激活细胞分离仪的基本原理示意图

1, 光散射信号; 2, 流室; 3, 选样管; 4, 压液晶体; 5, 鞘流入口; 6, 分选信号; 7, 荧光信号; 8, 荧光检测器; 9, 滤光片; 10, 透镜; 11, 激光束; 12, 偏转的液滴; 13, 排废管; 14, 样品收集杯; 15, 偏转的液滴; 16, 偏转板; 17, 挡光片; 18, 光散射接受器。

目前,国外已试用本仪器分离表面标志(尤其是表面抗原的性质及数量)不同的细胞,不但能分离T或B细胞,而且还能分离出T细胞或B细胞的亚群,如抑制T细胞、辅助T细胞、杀伤T细胞或抗体产生的前驱细胞。还有人试用本仪器测定各种类型白血病细胞,这样可减少病人骨髓穿刺的痛苦,非常值得推广。

本文概要地介绍了分离纯化免疫活性细胞的各种方法,其中以密度梯度离心法最常用,但纯度不够,往往在此基础上再进行其他分离法,即可达到欲分离特殊免疫活性细胞的要求。1979年Hass和Von Boehmer^[68]综述了分离抗原特异淋巴细胞的各种方法,极有参考价值。

参 考 文 献

- [1] 玉置憲一: 最新医学, 1979, 34, 1903.
- [2] Cantor, H. A. & Boyse, E. A., *J. Exp. Med.*, 1975, 141, 376.
- [3] Cantor, H. A. & Boyse, E. A., *J. Exp. Med.*, 1975, 141, 1390.
- [4] Krakauer, R. S. et al., *Science*, 1977, 196, 56.
- [5] Kotiainen, S. & Feldmann, M., *Eur. J. Immunol.*, 1977, 7, 310.
- [6] 橘 武彦: 临床免疫, 1977, 9, 118.
- [7] Waksman, B. H., *Clin. Exp. Immunol.*, 1977, 28, 363.
- [8] 朱炳法等: 临床免疫与实验免疫, 1980, 1(4), 21.
- [9] Gupta, S. & Good, R. A., *J. Immunol.*, 1979, 122, 1214.
- [10] Moretta, L. et al., *Immunol. Rev.*, 1979, 45, 16.
- [11] Lum, L. G. et al., *J. Immunol.*, 1980, 124, 702.
- [12] Spiegelberg, H. L. & Melewiez, F. M., *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1980, 15, 424.
- [13] Sjöberg, O., *Scand. J. Immunol.*, 1980, 11, 377.
- [14] Cantor, H. A. & Boyse, E. A., Regulation of the immune response by T cell subclasses. *Contemporary Topics in Immunobiology*, 1977, 7, 47. Hanna, M. C. (ed.), Plenum Press.
- [15] 吉田弥太郎(吉田): 临床免疫, 1980, 12, 371.
- [16] Greenstein, J. L. et al., *J. Immunol.*, 1980, 124, 1472.
- [17] 朱炳法: 国外医学, 免疫学分册, 1980, 3(4), 195.
- [18] Eremin, O. et al., *Cell Immunol.*, 1979, 47, 332.

- [19] Herberman, R. B. et al., *Immunol. Rev.*, 1979, **44**, 43.
- [20] Lotzová, E. & McCreide, K. B., *Cancer Immunol. Immunother.*, 1978, **4**, 215.
- [21] Pross, H. E. & Baines, M. C., *Cancer Immunol. Immunother.*, 1977, **3**, 75.
- [22] 朱炳法: 临床免疫与实验免疫, 1980, **1**(1), 59.
- [23] Herberman, R. B. & Holden, H. T., *J. Natl. Cancer Inst.*, 1979, **62**, 441.
- [24] Henney, C. S. et al., *Amer. J. Pathol.*, 1978, **93**, 459.
- [25] 金田一孝: 临床检查, 1979, **23**, 1119.
- [26] Young, W. W. et al., *J. Immunol.*, 1980, **124**, 199.
- [27] Konde, Y. & Takasugi, M., *J. Natl. Cancer Inst.*, 1977, **59**, 1099.
- [28] Gupta, S., *N. Y. State J. Med.*, 1976, **76**, 24.
- [29] Barber, H. R. K., *Immunology for the Clinician*, 1977, 35. A Wiley. Medical Publication.
- [30] 程一樞、钱振超: 国外医学, 免疫学分册, 1980, **3**(1), 20.
- [31] Evans, C. A. & Middleton, V. L., *J. Clin. Pathol.*, 1970, **23**, 822.
- [32] Ly, I. A. & Mishell, R. I., *J. Immunol. Methods*, 1974, **5**, 239.
- [33] Telley, T. & Rubinstein, P., *Transfusion*, 1970, **10**, 223.
- [34] Boyum, A., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1968, **21**(suppl. 97), 77.
- [35] 坂根 刚: 最新医学, 1979, **34**(9), 1887.
- [36] Shortman, K., Separation methods for lymphocyte population. *Contemporary Topics Molecular Immunology*, 1974, **3**, 161, Ada, G. L. (ed.).
- [37] Adam, P. B., *Cell Immunol.*, 1973, **5**, 356.
- [38] Plotz, P. H. & Talal, N., *J. Immunol.*, 1967, **99**, 1236.
- [39] Rutishauser, U., *Immunochemistry*, 1975, **12**, 603.
- [40] Salerno, A. & Pontieri, G. M., *Clin. Exp. Immunol.*, 1969, **5**, 209.
- [41] Thomas, D. B. & Phillips, B., *Eur. J. Immunol.*, 1973, **3**, 740.
- [42] Wigzell, H., *Scand. J. Immunol.*, 1976, **5**(suppl. 5), 23.
- [43] Wigzell, H. & Mäkelä, O., *J. Exp. Med.*, 1970, **132**, 110.
- [44] Wigzell, H., *Scand. J. Immunol.*, 1972, **1**, 75.
- [45] Schlossman, S. K. & Hudson, L., *J. Immunol.*, 1973, **110**, 313.
- [46] Iversen, I. G., *Nature*, 1973, **243**, 23.
- [47] Jacoby, W. B. & Wilchek, M., *Methods in Enzymology*. 1974 **34**, 195, Academic Press.
- [48] Henry, C. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1972, **69**, 34.
- [49] Scott, D. W., *J. Exp. Med.*, 1976, **144**, 69.
- [50] Truffa-Bachi, P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1970, **66**, 685.
- [51] Wofsy, L., *J. Immunol.*, 1971, **107**, 725.
- [52] Davis, J. M. et al., *J. Exp. Med.*, 1971, **134**, 517.
- [53] Choi, T. K. et al., *J. Exp. Med.*, 1974, **139**, 761.
- [54] Haller, O. et al., *Eur. J. Immunol.*, 1978, **8**, 765.
- [55] Hellstedt, H. & Holm, G., *Clin. Exp. Immunol.*, 1976, **17**, 371.
- [56] Gupta, S., *J. Immunol.*, 1979, **123**, 2664.
- [57] Gupta, S. & Good, R. A., Lymphocyte subpopulations and functions in hypersensitivity disorders, *Cellular, Molecular, and Clinical Aspects of Hypersensitivity Disorders* 1979, 96, Plenum Medical Book Company.
- [58] Platsoucas, C. D. & Catsinnoolas, N., *J. Immunol. Methods*, 1979, **26**, 245.
- [59] Kaplan, J. H. et al., *J. Immunol. Methods*. 1979, **27**, 241.
- [60] Zucker, R. M. & Helfman, D. M., *Cell Immunol.*, 1976, **22**, 43.
- [61] Wigzell, H., cellular immunosorbents, *Progress Immunology I*. 1971, P. 1105, Amos, B. (ed.), Academic Press.
- [62] Kedar, E. et al., *J. Immunol. Methods*, 1974, **5**, 97.
- [63] Ghetie, V. & Sjöquist, J., *J. Immunol.*, 1975, **115**, 659.
- [64] Nash, A. A., *J. Immunol. Methods*. 1976. **12**, 149.
- [65] Brondz, B. D. & Snegiröva, A. E., *Immunology*, 1971, **20**, 457.
- [66] Greenberg, A. H. et al., *Nature*, 1973. **242**, 111.
- [67] Golan, D. T. & Borel, Y., *J. Exp. Med.*, 1972, **136**, 305.
- [68] Haas, W. & Von Boehmer, H., Techniques for separation and selection of antigen specific lymphocytes. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 1979, 84, 948, Arber, W. et al. (eds.).
- [69] Horan, P. K. & Wheelless, L. L., *Science*, 1977, **198**, 149.
- [70] Hulett, H. R. et al., *Clin. Chem.*, 1973, **19**, 813.

- [71] Julius, M. H. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1972, **69**, 1934.
[72] Loken, M. R. & Herzenberg, L. A., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1975, **254**, 163.
[73] Nossal, G. J. V. et al., *Eur. J. Immunol.*, 1978, **8**, 151.
[74] Tam, M. R. et al., *J. Immunol.*, 1980, **124**, 650.

24

免疫活性细胞的杂交及其应用

葛 锡 锐

(中国科学院细胞生物学研究所)

一、引言

二、骨髓瘤及其特征

三、B 细胞杂交株的建立

四、T 细胞杂交株的建立和应用

五、展望

1. 在基础免疫学方面

2. 应用免疫学

一、引言

在免疫学的发展历史上,在渡过它缓慢的发展时期以后进入了迅速发展的阶段(包括概念上或方法学上的发展)。免疫学作为一门独立的学科是在本世纪初叶自 Roux 和 Behring 开始的,当时他们提出了功能(免疫性)与结构(抗体)的关系。其后的三十年乃是阐述了抗原和抗体的特异性和抗原抗体反应的机制。由于免疫血清中的免疫球蛋白是多克隆的,也就是说抗体的异质性很大,极大阻碍了这一学科的发展。五十年代,当发现骨髓瘤(亦称浆细胞瘤)产生类似抗体的免疫球蛋白后,就进入了一个非常重要的阶段,首先,搞清了骨髓瘤蛋白质的一级结构,三维结构空间的微细结构等,以后发现了数量不大,但是能跟某些小分子的化学物质(如三硝基酚、磷酸胆碱、维生素K等)有高度亲和性的骨髓瘤蛋白质(与半抗原和它相应免疫抗体的亲和性相似)。这一发现把诱发产生的抗体和骨髓瘤蛋白质联系了起来,从而为对骨髓瘤蛋白质分子上的结合部位的研究开辟了道路。1960年 Barski^[1] 等人对小鼠肿瘤细胞在体外成功地进行杂交,开辟了哺乳类细胞遗传的新纪元。1962年 Okada^[2] 使用仙台病毒作为融合因子使融合率增加,有助于使这一方法得到发展。1965年当 Sacks^[3] 访问 Salk 研究所时,与 Horibata 等人一起实验,建立的小鼠骨髓瘤能产生大量 IgG₁ 类型的骨髓瘤蛋白质——被称为 MOPC-21 的一株细胞(在 Salk 研究所被称为 P₃),由于冰冻过的这株细胞未能在体外继续生长而未发表这一重要发现。1970年由于 Horibata 和 Harris 重新建立了一株 P₃ 细胞,现称之为 P₃K 的细胞株之后不久, Scharff 等在爱因斯坦学院建立了 MPC 细胞株。这株细胞成株的效能非常高,在研究这株细胞产生免疫球蛋白的稳定性时,发现每传一次代,每个细胞重链的合成和分泌会以 1×10^3 的高速率丢失,而同时不分泌免疫球蛋白的突变细胞出现频率也很高,这就为尔后 Köhler 和 Milstein 的杰出发现奠定了基础。有人估计^[4-6] 纯系小鼠的抗体库范围约在 $1 \sim 5 \times 10^7$ 之间。识别一个单一的抗原决定簇的抗体分子在 $1000 \sim 8000$ 之间。当用异种细胞免疫小鼠时,鼠可识别细胞表面上的 $10 \sim 100$ 个不同的抗原,这些抗原可能具有五种不同的主要的抗原决定簇,一个小鼠对这五种抗原决定簇可产生五种不同的抗体,一般地说,这些抗体与另一只小鼠对同样的抗原决定簇产生的抗体是不同的,上述血清有四个主要的缺点: 1. 效价低; 2. 抗体的异质性; 3. 量有限 4. 难以重复。

用杂交淋巴细胞的方法就可提供一个极有力的工具来打破上述限制。Milstein^[7] 在进行两株浆细胞瘤杂交工作时,得到了一株对 8-氮鸟嘌呤(8-azaguanine)有抵抗力的 P₃ 的亚系,现在称之为 P₃/X63-Ag8。这株细胞可继续产生两株亲代细胞的骨髓瘤蛋白质,以后他们进行了重要而大胆的试验。即把产生抗体的细胞变成“永久化”或“永久型”的细胞株。换言之,就是通过细胞杂交的办法把免疫活性细胞的染色体组引进至一种永久的细胞,如引入骨髓瘤细胞中去。自 1975 年^[8]成功地进行了这种实验以来发展极为迅速,引起了免疫学的革命。

二、骨髓瘤及其特征

Potter 多次发表文章指出^[9,10],迄今为止,在两个品系小鼠(Balb/c 和 NZB)中比较容易获得骨髓瘤,除自发瘤外,最常用的诱发因子是矿物油(包括轻、重质),塑料片和扩散室等,也可用不完全佐剂诱发,在那些矿物油中含有直链、支链和饱和环状碳氢化合物。以 4 甲基 15 烷(Pristane、降植烷)为例(图 1),是很有效的诱发剂,特点是诱发期短。

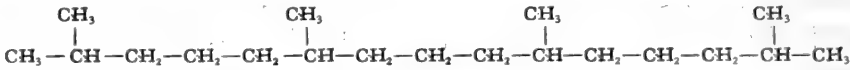


图 1 降植烷分子式

注入矿物油后数日内,出现油性肉芽肿,包括充满油滴的组织细胞,并且互相粘连,通常位于迴盲部的粘膜层上,四个月内可出现瘤,诱瘤率达 50~60%。

骨髓瘤的特征是:

第一,能产生免疫球蛋白,但并不是唯一能产生免疫球蛋白的肿瘤。可以是分泌或不分泌的,这种免疫球蛋白是均质的,因而是单克隆起源的,但在小鼠中它不是唯一能产生免疫球蛋白的肿瘤,表 1 列举了小鼠中产生免疫球蛋白的肿瘤。至今人类的骨髓瘤能产生已知的五种免疫球蛋白中的任何一种。小鼠的骨髓瘤能产生除 IgD 以外的任何免疫球蛋白,但依据 Herzenberg^[11],美国 NIH 的国立肿瘤研究所在诱发的小鼠骨髓瘤中已找到二株能产生 IgD 的骨髓瘤,但是至今未见任何材料发表。

表 1 产生免疫球蛋白的小鼠肿瘤

肿瘤起源的正常细胞	免疫球蛋白的产生		肿 瘤
	细胞表面	分泌	
B 淋巴细胞	+	—	淋巴瘤瘤
T 淋巴细胞	+	—	淋巴瘤瘤
免疫母细胞	?	+	浆细胞白血病
浆细胞	+	±或—	网质细胞 B 型瘤
淋巴浆细胞	?	+	(浆细胞瘤)骨髓瘤
			淋巴肉瘤

第二,这个单克隆细胞株可产生反常的增生特性;从带瘤动物的血清、腹水和尿中提取大量免疫球蛋白。在 Balb/c 鼠中诱发的肿瘤约 60% 为产生 IgA 类免疫球蛋白的骨髓瘤诱发时产生免疫球蛋白的骨髓瘤的分布,移植肿瘤可长到体重的 1/3。皮下接

种时,移植肿瘤十分稳定,可连续许多代产生免疫球蛋白。诱发产生 IgA 骨髓瘤的比例并不能反映 IgA 在血清中的浓度,在 Balb/c 血清总蛋白中, IgA 所占的比例不足 15% (0.7~0.8 毫克/毫升),比其他品系低,可能由于:(1)分泌 IgA 的细胞在遗传上的易感性;(2)可能分泌 IgA 的浆细胞易进入腹腔并转化为癌细胞。

第三,业已发现某些骨髓瘤产生的免疫球蛋白能结合抗原。例如产生 IgM 的 MOPC 104 瘤细胞能与 α_{1-3} 连接的葡萄糖专一地结合。

三、B 细胞杂交株的建立

将免疫小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞进行融合,常用的融合剂有仙台病毒和聚乙二醇,融合后的细胞在一种选择性的溶液 HAT 液中进行选择,在 14 天的选择期内,用于杂交

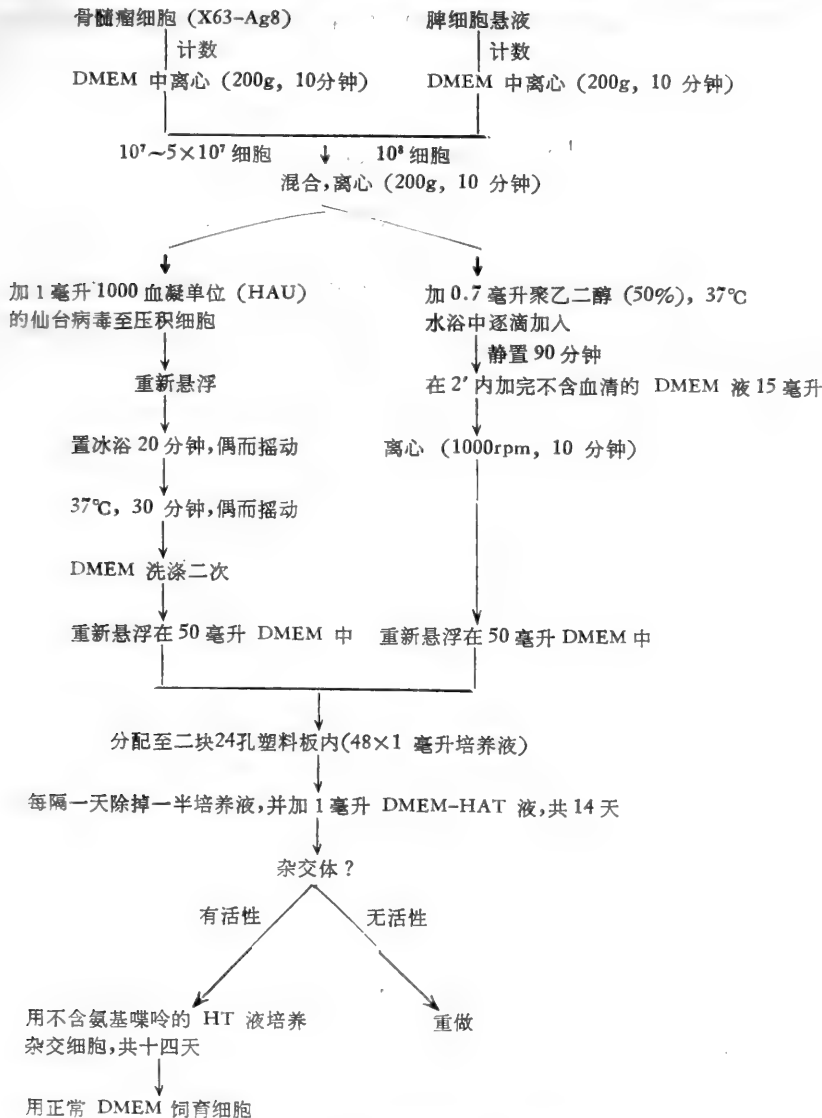


图 2 杂交瘤细胞株操作示意图

的亲代细胞均能死亡,因为瘤细胞虽能在体外连续繁殖生长,但用作杂交的瘤细胞是一种有酶缺陷的细胞——缺少 HGPRT 酶或 TK 酶。它们无法利用培养液中 HAT 以合成新的核酸,而趋于死亡。利用测定有功能的杂交体的方法找出所需要的杂交体进行繁殖。B 细胞杂交株的操作见图 2。用作杂交的脾细胞和瘤细胞的比例是 2:1~10:1,在融合因子的作用下,使两类细胞发生融合,可以使用仙台病毒作融合因子,目前更多的趋势是使用聚乙二醇(分子量在 1,000~4,000 之间),细胞被分配到塑料板内,在 HAT 液中选择二周左右,存活的杂交细胞经过进一步选择(图 3),可得永久细胞株,不仅可在体外繁殖这些细胞株,也可将细胞再接种回动物,在动物的血液、腹水和尿液中可以找到杂交细胞分泌的大量产物,借助现代生化和免疫化学技术如免疫电泳分析、等电点聚焦等方法对其进行分析。Hämmerling 等^[12]把 Balb/c 小鼠的 HGPRT⁻ 的 X63-Ag8 骨髓瘤细胞和 C₃H 小鼠的 TK⁻ 的 G_{1.18} 骨髓瘤细胞的融合效率进行了对比后发现 X63-Ag8 (HGPRT⁻) 细胞株产生杂交细胞株的效能比较高(见表 2)。常用作融合的瘤细胞株的特征如表 3 所示。

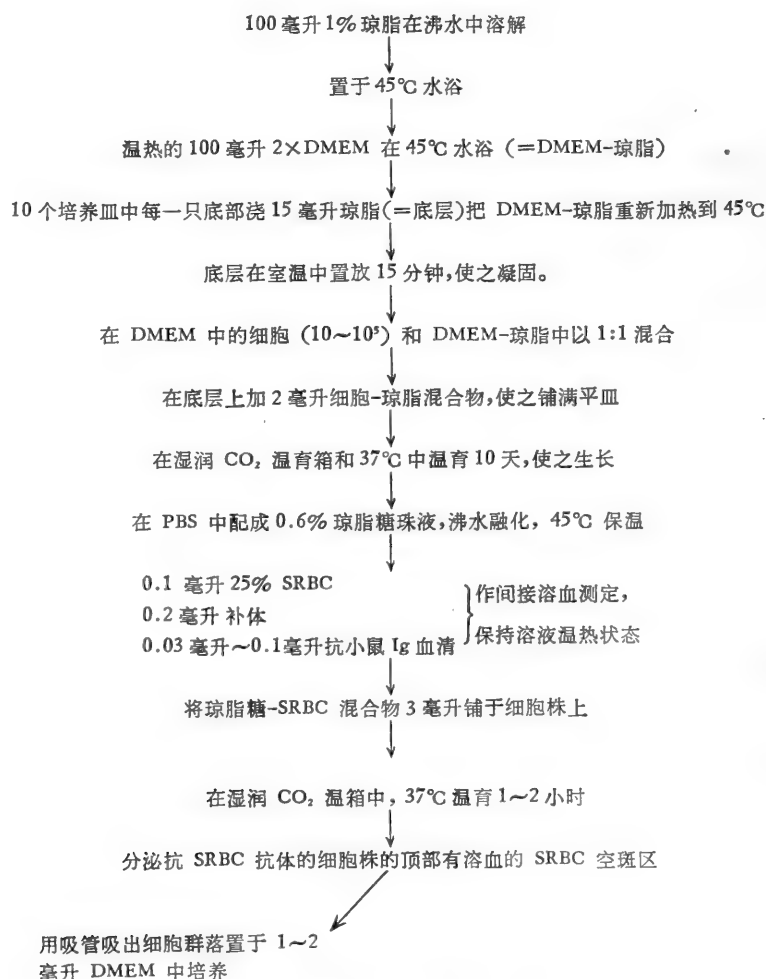


图 3 杂交瘤细胞在软琼脂中的成株

表 2 X63Ag8 和 C_{1.11} 融合效能的比较

骨髓瘤	融合脾 细胞数	全部杂交细胞株 (每 10 ⁵ 细胞)	双重产生者*
X63-Ag8	14×10 ⁵	206(14.2)	21/41
C _{1.11}	8×10 ⁵	21(2.6)	3/5

* 指既产生脾细胞分泌的免疫球蛋白,也产生亲代骨髓瘤细胞分泌的骨髓瘤蛋白质的杂交细胞,约有 50% 的杂交细胞是具有这类特征的细胞。

表 3 常用作融合的瘤细胞株的特征

全 名	简 称	染色体数	免疫球蛋白	动物品系	特 征
P3/X63-Ag8	X63	65	IgG ₁ , K	Balb/c	浆母细胞瘤
NS1-Ag4/1	NS-1	65	K, 细胞内	Balb/c	浆母细胞瘤
MPC11-X45-6TG1.7	X45	62	K, IgG _{2b}	Balb/c	浆母细胞瘤
X63-Ag8.6.5.3	X63-653	58	—	Balb/c	浆母细胞瘤
SP2/0-Ag14	SP ₂	72	—	Balb/c	X63-Ag8和Balb/c 脾的杂交细胞
BW5147	BW			AKR	胸腺淋巴瘤 (Ly ⁻ , 2 ⁻ , 3 ⁻ , 6 ⁺)
EL ₄	EL ₄			C ₃ H	胸腺淋巴瘤 (Ly ⁻ , 2 ⁻ , 3 ⁻ , 6 ⁺)
C _{1.11}				C ₃ H	浆细胞瘤 (TK ⁻)

应该如何选择用作融合的免疫活性细胞? 至今尚无定论。

Claflin 和 Williams^[13] 就免疫后 3~5 天取出的脾脏作融合(表 4), 得到阳性细胞株的最适时间是在最大 PFC 产生前, 表明融合实际上可能出现在前浆细胞而不是成熟浆细胞阶段。

表 4 免疫后不同时间取脾对抗 P-C 杂交细胞的影响

	注射 R36A 后天数		
	3	4	5
PFC/10 ⁶ 细胞	80	250	810
阳性杂交细胞数 (20 天)	21	543	282
成功的杂交细胞数 (60 天)	12	295	135
抗 P-C 克隆	4	3	0

B 细胞杂交株的建立使人们确信, 目前已有可能对几乎任何临床或实验室的免疫测定, 源源不断地提供纯化的、标准的、特异的、均质的抗体。自 1975 年以来, 许许多多的试剂已在不同实验室得到, 要对此作一全面的系统的分析已很困难, 已有不少专著论及^[3,14]。这里仅就一部分的进展作一叙述。

1980 年 Accolla 等^[15]将人的 CEA 抗原注入小鼠, 取脾细胞与 P₃/NS-1/1-Ag4 细胞杂交, 得到的是能产生针对 CEA 分子上的两个不同的抗原决定簇起特异反应的抗体的两株杂交细胞株, 这两株细胞产生的单克隆抗体不仅量不受限制, 而且其亲和性相当高。既可用于对 CEA 的免疫化学特征的研究, 也可用作鉴定 CEA 抗原在人体组织中和体液中的分布的标准试剂。

Yoshida 等^[16]将疟原虫的生殖芽胞免疫小鼠的脾脏与骨髓瘤细胞杂交, 得到能产生对疟原虫生殖芽胞表面膜蛋白质(称为 Pb44 的一种分子量约 44,000 的蛋白质) 专一抗

体的杂交细胞株,如将上述抗 Pb44 的单克隆抗体与生殖芽胞在体外一起温育,可以消除其感染性。

Bussard 等^[17,18]曾经尝试对非免疫小鼠的腹腔细胞进行分析,如果把它同小鼠骨髓瘤细胞杂交,可得到产生大量自体抗体的细胞株。他们将 NZB 小鼠的腹腔细胞经 4~5 天培养后可对菠萝蛋白水解酶处理过的自体红细胞 [MRBC(br)] 形成多达 10% 的溶血空斑细胞。如果采用 SRBC 做溶血空斑反应,那么空斑反应比例要小。这是二类红细胞上的抗原决定簇具有交叉反应之故,把小鼠腹腔细胞与产生 K 型 IgG 的骨髓瘤杂交可以连续不断地产生抗 MRBC (br) 的溶血空斑细胞,分泌大量抗 MRBC (br) 的 IgM 型溶血素,对不同杂交体的分泌类型所作的分析表明,它们是极其相似的,活跃地分泌抗 MRBC (br) 抗体的杂交瘤细胞,可达总数的 80%。但是分泌抗 RBC 的细胞株则少得多,约占总细胞数的 5%。用两种类型的红细胞基质的抑制试验表明,在两种指示 RBC 中,加 5 个和 10 个 MRBC (br) 的红细胞基质时,其相应的抑制率达 97% 和 99%;而加 5 个和 10 个 SRBC 基质时,相应的抑制率仅为 2% 和 37%,这表明产生同质抗体的杂交细胞瘤株间的差异仅是分泌速率的差异,即产生的量上的差异,而抗体的结构上无差异,只有分泌力强的杂交细胞株才能产生 SRBC 空斑。这些能产生大量抗自身成分的抗体的杂交细胞,对于了解这些自身抗原的本质和特异性是有帮助的。也有助于制备特异的抗个体型个体及了解调节自体抗体产生的机制。

Andrzejewski 等 1980^[19]在一种 MRL/1 小鼠上工作,该小鼠可发生严重的系统性红斑狼疮,并能自发产生很高水平的针对 DNA 的自体抗体。他们将该种动物的脾脏与骨髓瘤细胞杂交,杂交细胞能分泌对 DNA 的自体抗体,由于并未用抗原对该种小鼠免疫,上述杂交瘤产生的抗体实际上来自能自发地产生自体抗体的 B 淋巴细胞。结果表明每一个杂交细胞株产生的自体抗体同天然 DNA、单链 DNA 或寡核苷酸有不同的结合专一性。

对小鼠和人 T 淋巴细胞的表面抗原,也可用杂交法制成产生对上述表面抗原的抗体的细胞株,借以获得大量单克隆抗体,加以分析研究,并作治疗的尝试,业已获得成功。

Bernstein 等^[20]将抗小鼠胸腺细胞分化抗原 (Thy1.1) 的单克隆抗体用来治疗移植的小鼠白血病,被动免疫可使治疗小鼠血清中出现高效价的细胞毒性抗体,并能抑制移植的肿瘤细胞的生长,如果在此基础上再给予外源的补体,可扩增该单克隆抗体的抑制肿瘤生长的效应。用上述单克隆抗体加补体的被动免疫治疗法可治愈部分小鼠的白血病。

Reinherz 等^[21]将人胸腺细胞免疫小鼠,取鼠脾与骨髓瘤细胞杂交,杂交细胞可产生针对人细胞毒性/抑制 T 细胞的单克隆抗体,他们将这株细胞定名为 OKT₃,间接荧光反应显示,抗体可与 80% 的人胸腺细胞发生反应,而与人外周血的 T 细胞的反应则只有 20%。但与正常 B 淋巴细胞、裸细胞和巨噬细胞则均不发生反应。马抗人胸腺细胞抗血清(称为抗 TH₂)也有类似的反应方式。上述杂交细胞跟 TH₂ 阳性的细胞亚群一样,能与 ConA 和同种异抗原起很好的反应。在抗原致敏后的混合淋巴细胞反应中,含有细胞毒性的效应细胞,而在 ConA 激活后产生抑制的效应细胞,它们对可溶性抗原均不发生反应。因而上述单克隆抗体为检测人类疾病中抑制细胞的状态提供了一个重要的探针。

Engleman 等^[22]将人 T 细胞免疫小鼠,取鼠脾与骨髓瘤细胞融合,得到可产生对人一种亚类 T 细胞的单克隆抗体的细胞株。该抗体可与 30~35% 的人外周 T 细胞发生反应

(Ta⁺ 细胞),但不能结合其余的 T 细胞(Ta⁻ 细胞)、B 淋巴细胞和巨噬细胞。可借助荧光激活细胞分类器将 Ta⁺ 和 Ta⁻ 细胞分开,并检测它们在体外对各种刺激的反应。结果表明 Ta⁺ 细胞对 ConA 反应时可引起很强的增生反应。

Haynes 等^[23]自一株人 T 细胞株 HSB-2 细胞免疫 Balb/c 小鼠,得到脾细胞,与 P₃X63/Ag8 骨髓瘤细胞融合,结果产生的是一株对人 T 细胞的细胞株,取名 3A₁,分泌的单克隆抗体可与 65% 的人外周血 T 淋巴细胞特异地结合,但不能结合具补体受体的人外周血 B 淋巴细胞、多形核白血球或红血球等。纯化的外周血 T 细胞,能与 3A₁ 抗体发生反应的 T 细胞 (3A₁⁺ 细胞)在受 PHA 或 ConA 刺激时,可得最大的 ³H-胸腺嘧啶核苷的参入,而纯化的与 3A₁ 抗体不发生反应的 T 细胞则对 PHA 的反应较次,而对 ConA 的最小。故借助上述抗体可以很容易将 3A₁⁺ 和 3A₁⁻ 细胞在正常和异常的人免疫反应中的调节作用加以分别研究。

四、T 细胞杂交株的建立和应用

T 细胞杂交的困难似乎较 B 细胞杂交大,主要的原因是缺乏一个高效能的探查方法来指明分泌性的杂交瘤。用通常的骨髓瘤的杂交方法得不到具有 T 细胞特性的 T 细胞-骨髓瘤杂交细胞。

Goldsby^[24] 用缺酶的 T 淋巴瘤和 T 细胞杂交,结果获得了具有 T 细胞特性的杂交瘤。此后,大量的研究表明 T 细胞杂交株的建立也是不成问题的。

Grützmann 和 Hämmerling^[25] 对 T 细胞杂交瘤的产生和特征做过详细分析,他们用 BW5147 (clone 4) 瘤细胞株与 10⁵ 淋巴细胞成功地产生 1—3 个杂交细胞瘤。

BW5147 与 C₅₇Bl/6 脾细胞融合得到的杂交细胞的表面分析见表 5。

表 5 BW5147 与 C₅₇Bl/6 的脾细胞融合的杂交细胞的表面分析

杂交细胞	Thy-1		H-2		Ig	B 细胞 Ia	染色体(范围)
	1.1	1.2	k	b			
T-48-3	+	+	+	+	-	-	58~65
T48-7	+	+	+	+	-	-	48~65
T48-11	+	+	+	+	-	-	41~44
T48-12	+	+	+	+	-	-	42~46
T44-2	+	+	+	+	-	-	34~37
T56-3	+	+	+	+	-	-	未 做
T48-5	+	+	+	-	-	-	41~48
T56-2	+	+	-	+	-	-	45~48
T56-1	+	-	-	+	-	-	42~47
BW5147	+	-	+	-	-	-	38~40
C ₅₇ Bl/6 脾	-	+	-	+	+	+	未 做

从本质上看,杀伤 T 细胞可能不能制成杂交体,因为它们可以非特异地杀伤与它们配对的亲本细胞——T 细胞淋巴瘤,这一点已为实验所证实^[25](见表 6)。

Iversen 等^[26]研究了 T 淋巴细胞瘤和 T、B 淋巴细胞的杂交后指出, BW5147 淋巴瘤细胞并非只是选择性地与 T 细胞杂交。正如骨髓瘤细胞不只是跟 B 细胞杂交一样,后

表6 B10. Br(H-2^k) 抗 C₃₇B1/6(H-2^b) 细胞毒性 T 细胞在融合因子存在时对靶细胞的非特异性融解

靶 细 胞	试 剂	⁵¹ Cr 释放%	
		CTL	EL ₄
EL ₄ (H-2 ^b)	—	38.8	0
BW5147	—	7.6	0
BW5147	PHA	44.1	0
BW5147	PEG4000	48.5	26.5
BW5147	仙台病毒	24.5	13.0

者也可与T细胞杂交,但不能显示T细胞的特征和功能。同样,T淋巴瘤也可与B细胞杂交,其融合率如下:

$$BW5147 \times Ig^{+} \quad 37/72$$

$$BW5147 \times Ig^{-} \quad 21/72$$

可见与B细胞的融合效率并不低,但是得不到有功能的B细胞杂交体。

Taniguchi 和 Miller^[27] 将富含抑制T细胞的细胞悬液与T淋巴细胞瘤细胞株进行融合,杂交体产生特异的抑制因子。在作者建立的18个杂交瘤株中,6个细胞株显示特异的抑制活性,5个细胞株具有非特异的抑制活性,7个细胞株无活性,但是大多数细胞株在三个月内逐渐丧失它的正常细胞亲本所具有的免疫活性,只有一株细胞株(*77号)仍具活性。与免疫活性丧失相伴随的是染色体数目的变化。

Julius 和 Augustin^[28] 将对 KLH 特异的辅助T细胞 (AKR 与 CWB 小鼠) 与 HGPR⁺ 的胸腺瘤细胞株 BW5147 杂交,结果表明48个同种异体(即 CWB 鼠T辅助细胞与胸腺瘤的杂交细胞株)的杂交细胞株,没有一个具有明显的辅助活性。在34个同种同基因的杂交体(两个亲本均来自 AKR⁺品系小鼠)中,4个具有明显的辅助活性,并具有对 KLH 抗原的特异辅助能力。经培养三个月后检查,仍具有辅助活性。

Herzenberg 等^[29]全面地叙述了免疫活性细胞杂交方法及其应用后指出,如果选择了合适的母本,即具有分化了的细胞类型的淋巴肉瘤,对具有类似表型的杂交瘤的培养成功与否具有决定性的意义。他们并且指出,用T细胞杂交瘤来分析免疫系统和其潜在的临床应用,肯定会在不久得到迅速的发展。

至今还没见到有关免疫活性细胞中的另一大类细胞——巨噬细胞与瘤细胞杂交的报道。很可能跟T杀伤细胞一样,作为对于杀伤瘤细胞起效应作用的巨噬细胞会吞噬它的“配偶”——瘤细胞,并将其消化。

五、展 望

淋巴细胞杂交瘤是一个很好的方法,用来进行制备大量单克隆抗体和许多具有免疫活性的因子。

1. 在基础免疫学方面

(1) 抗体结构 预先规定其特异性,大量产生的单克隆抗体,有助于对其一级结构的分析研究,尤其是高度可变区氨基酸的顺序以及它们与结合部位的关系的研究,亦有助

于对抗体分子三度空间结构的研究(X线衍射等)。亦可对异型和个体型进行分析。

(2) 免疫球蛋白的生物合成 杂交细胞可以产生对特异抗体编码的信息核糖核酸,有助于解决近代分子免疫学中“未转译的环”的问题。借杂交体的长期培养和使用突变因子可以研究抗体多样性产生的问题,开拓了研究两个基因组之间的相互作用的途径。

(3) 免疫球蛋白合成的细胞调节 可用杂交细胞瘤来研究B细胞分泌抗体的正负反馈问题,如抗体在体外分泌的浓度问题必然有助于了解在体内发生了些什么,研究调节基因对免疫分泌物的控制等。

(4) 抗原抗体反应 至今,多数抗原抗体反应的研究是用不同的抗体分子混合的抗血清来实施的。杂交瘤细胞产生的是只对单一抗原决定簇的抗体,用它进行研究,将更有说服力。

(5) 抗原的测定 特别是细胞表面的抗原,至今较难得到大量而完全纯化的抗原,借助杂交细胞只对单一抗原决定簇反应的特性,借以获得纯化抗原。

(6) 基因定位的研究 对免疫球蛋白或其他免疫产物的基因在染色体上的定位进行研究。将人淋巴细胞与小鼠肾癌细胞杂交,只有含人第六对染色体的杂交细胞可分泌IgG重链,对IgG重链的结构基因的定位提供有力依据。

2. 应用免疫学

(1) 诊断 提供大量临床免疫化学的诊断试剂,特别是用于组织配型、病毒、细菌等的诊断试剂。

(2) 治疗 提供抗病毒抗体等用于治疗。

(3) 生物免疫工程 提供各种因子。

总之,将细胞融合方法介入免疫学是一个很大的方法学上的突破,将对分子免疫学和细胞免疫学的进展起很大推进作用。

参 考 文 献

- [1] Barski, G. et al., *C. B. Acad. Sci.*, 1960, **251**, 1825.
- [2] Okada, Y., *Exp. Cell Res.*, 1962, **26**, 98.
- [3] Merchers, F. et al., *Current Topics in Microbiol. and Immunol.*, 1978, **81**, 1.
- [4] Klinman, R. N. & Press, J. L., *Transpl. Rev.*, 1975, **24**, 41.
- [5] Kreth, H. & Williamson, A., *Eur. J. Immunol.*, 1973, **3**, 141.
- [6] Köhler, G. et al., *Eur. J. Immunol.*, 1976, **6**, 292.
- [7] Cotton, R. G. & Milstein, C., *Nature*, 1973, **244**, 42.
- [8] Köhler, G. & Milstein, C., *Nature*, 1975, **256**, 495.
- [9] Potter, M., *Methods in Cancer Res.*, 1967, **2**, 105.
- [10] Potter, M. et al., *J. N. C. I.*, 1975, **54**, 1413.
- [11] Herzenberg, L. A., *Personnal Communication*, 1980.
- [12] Clafin, L. & Williams, K., *Current Topics in Microbiol. & Immunol.*, 1978, **81**, 107.
- [13] Hämmerling, G. J. et al., *Protides Biol. Fluids*, 1978, **25**, 551.
- [14] Milstein, C. et al., *Cell Biol. Inter. Report*, 1979, **3**, 1.
- [15] Accolla, R. S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1980, **77**, 563.
- [16] Yoshida, N. et al., *Science*, 1980, **207**, 71.
- [17] Bussard, A. E. & Pagès, J. M., *Prog. Clin. Biol. Res.*, 1978, **26**, 167.
- [18] Pagès, J. M. & Bussard, A. E., *Cell Immunol.*, 1978, **41**, 188.
- [19] Andrzejewski, C. Jr. et al., *J. Immunol.*, 1980, **124**, 1499.
- [20] Bernstein, I. D. et al., *Science*, 1980, **207**, 68.



- [21] Reinherz, E. L. et al., *J. Immunol.*, 1980, **124**, 1301.
- [22] Engleman, E. G. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1980, **77**, 1607.
- [23] Haynes, B. F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1979, **76**, 5829.
- [24] Goldsby, R. A. et al., *Nature*, 1977, **267**, 707.
- [25] Grutzmann, R. & Hammerling, G. J., *Current Topics in Microbiol. and Immunol.*, 1978, **81**, 188.
- [26] Iverson, G. M. et al., *Current Topics in Microbiol. and Immunol.*, 1978, **81**, 192.
- [27] Taniguchi, M. et al., *J. Exp. Med.*, 1978, **148**, 373.
- [28] Julius, M. H. et al., *Ann. Report (Basel)*, 1978, 53.
- [29] Herzenberg, L. A. et al., *Handbook of Experimental Immunol.*, 1978, Cha. 25, Weir, D. M. (ed.).

补 遗

鉴于这一领域进展神速,愿以补遗方式将笔者参加1981年10月在日本举行的国际杂交瘤与单克隆抗体讲习班上所见到的一些主要进展略举数例,以补原文之不足。

1. 推荐的用于融合的四株骨髓瘤细胞株为: S194/5.XXO.BU.1^[1]; SP2/0-Ag14^[2]; X63-Ag8.653^[3] 和 FO^[4]。

2. 混合抗原的单克隆抗体可采用所谓“瀑布式”(cascade)纯化法,即以多次融合试验加以逐一获得^[5]。

3. 建立的“永久型”杂交瘤细胞株的分泌抗体也会发生改变,如原分泌五聚体的具细胞毒性的 IgM 可变为分泌五聚体的(1)不具细胞毒性的 IgM; (2)亲和力低10倍的 IgM^[6]。原分泌 IgM, 现分泌 IgD, 专一性不变^[7]。原分泌 IgG₁ 亚类, 现分泌 IgG2a 亚类或 IgA, 专一性也不变^[8]。

4. 抗细胞表面抗原的单克隆抗体可用化学法接上蓖麻毒蛋白或白喉毒素,可在体外杀死靶细胞,可能被用为杀死肿瘤靶细胞的特异因子^[9,10]。

5. T细胞释放的抑制因子至今不能从正常,连续生长的T细胞株得到,但可自T淋巴瘤得到^[11]。

6. 业已发现合适的人骨髓瘤细胞株,已产生人抗麻疹病毒、SRBC、TNP 和内毒素的单克隆抗体,展现未来将用人杂交瘤取代目前用 EBV 转化法产生人单克隆抗体^[12,13]。

7. 成功的融合试验关键何在? 乃是在一清洁的工作场所进行操作的适宜的无菌技术。

参 考 文 献

- [1] Trowbridge, I. S., *J. Exp. Med.*, 1978, **148**, 313.
- [2] Shulman, M. et al., *Nature*, 1978, **276**, 269.
- [3] Kearney, J. F., *J. Immunol.*, 1979, **123**, 1548.
- [4] Fazekas de St. Groth, S. & Scheidegger, D., *J. Imm. Meth.*, 1980, **35**, 1.
- [5] Milstein, C., *Proc. Roy. Soc. Lond.*, 1981, B211, 393.
- [6] Köhler, G. & Schulman, M., *Eur. J. Immunol.*, 1980, **11**, 467.
- [7] Neuberger, M. S. & Rajewsky, K., *PNAS*, 1981, **78**, 1138.
- [8] Radbruch, A. et al., *PNAS*, 1980, **77**, 2909.
- [9] Youle, R. J. & Neville, D. M., *PNAS*, 1980, **77**, 583.
- [10] Gilliland, G. & Steplewski, H., *PNAS*, 1980, **77**, 4539.
- [11] Kontiainen, S. et al., *Immunology*, 1981, **43**, 747.
- [12] Croce, M. C. et al., *Nature*, 1980, **288**, 488.
- [13] Olsson, L. & Kaplan, H. S., *PNAS*, 1980, **77**, 5429.

北京植物所

收到期	82.11.15
来源	西单新
书价	1.75元
单据	0025348
开票	82.11.15.

230520 58.1573
610

免疫活性细胞免疫方法
进展, 1982年

借者	借期	借者	借期
1981.3.14			
1981.12.17	12月		
1981.12.15	15日		
1981.12.15	17日		

58.1573
610

230520

统一书号: 14031 · 36

定 价: 1.75 元

本社书号: 2687 · 14

科技新书目: 31-44